

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RÉSULTATS COMPARATIFS DES SÉRONEUTRALISATIONS
ET DES TITRAGES DU VIRUS POLIOMYÉLITIQUE
EXÉCUTÉS PAR MICROMÉTHODE
SUR PLAQUES EN MATIÈRE PLASTIQUE
ET PAR LA MÉTHODE CLASSIQUE SUR TUBES.

par P. LÉPINE, G. BARSKI (*) et M^{me} F. CORNEFERT (**).

(Institut Pasteur, Service des Virus)

Nous avons précédemment décrit [1] une technique de séro-neutralisation du virus de la poliomycélose selon une microméthode employant au lieu des tubes classiques renfermant des cellules sensibles pré-cultivées, des alvéoles creusées dans une plaque en matière plastique transparente, chaque alvéole représentant l'équivalent d'un tube individuel.

Selon ce procédé, les éléments du test, réduits à un volume minimum de dilutions nécessaires de virus et de sérum ajoutées à une suspension extemporanée de cellules sensibles, sont déposés en une opération unique dans chaque alvéole de la plaque. La lecture est faite d'après l'observation de l'effet cytopathogène spécifique qui se produit en deux à quatre jours et qui est suivi par examen microscopique à travers le fond transparent de l'alvéole.

(*) Adresse actuelle : Centre de Recherches d'Immuno-Pathologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mai 1956.

L'idée de remplacer les tubes de culture par des plaques en matière plastique de polyvinyl ou de polystyrène a été reprise par Melnick et Opton [2], ces auteurs ayant adopté, comme indice de la survie ou de la destruction cellulaire par le virus, la modification du pH du milieu reconnue au virage de teinte d'un indicateur coloré.

Notre expérience nous ayant montré que l'examen direct au microscope de l'effet cytopathogène est un indice à la fois plus sûr, plus constant et plus précis que le virage du pH, tout en se montrant plus économique en milieu de culture et en cellules, nous avons continué à employer la microméthode tant pour le titrage du virus poliomyélitique que pour celui d'autres virus dont l'action se manifeste par un effet cytopathogène. Toutefois, il nous a paru intéressant, tout en conservant le même principe, de perfectionner la méthode en remplaçant la matière plastique primitivement utilisée (Araldite B) par un matériau nouveau plus léger, plus économique et aussi bien toléré des cellules, et que son faible prix de revient permet d'utiliser sous forme de plaques minces qui, ne servant qu'une fois et jetées après emploi, simplifient considérablement les manipulations en supprimant complètement les opérations de lavage et de nettoyage qui, avec notre premier procédé, restaient nécessaires comme pour la verrerie.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

a) *Cellules.* — Tout matériel cellulaire pré-cultivé, répondant spécifiquement à l'action du virus examiné, peut être employé pour un microtest [3].

Dans les essais rapportés ici, le matériel cellulaire provient de cultures de rein de singe trypsiné préparées d'après les méthodes habituelles [4] dans des bouteilles de Roux de 1 l. On remet en suspension les cultures âgées de 7 à 20 jours, par incubation rapide avec une solution de trypsine à 0,10-0,20 p. 100, suivie d'une dispersion mécanique obtenue par aspiration répétée à l'aide d'une pipette Pasteur.

Après centrifugation à faible vitesse (cinq minutes à 1 000 t/min.) et élimination de la trypsine, on resuspend le culot cellulaire dans le milieu (voir plus loin) et on ajuste la densité de la suspension cellulaire de façon à avoir finalement 100 à 150 000 cellules par centimètre cube.

Une bouteille de 1 l de cellules pré-cultivées fournit ainsi en moyenne 20 à 30 ml d'une telle suspension. Comme le microtest ne demande qu'environ 5 000 cellules par unité de test pour apprécier l'effet cytopathogène, il est donc possible avec le contenu d'une seule bouteille de 1 l de fournir le matériel

nécessaire à 500 alvéoles correspondant à autant d'unités individuelles d'un test de séroneutralisation ou de titrage.

Dans le cas où l'on emploie une souche cellulaire entretenue en lignée continue comme la souche HeLa, on peut encore réduire très sensiblement le nombre des cellules nécessaires dans chaque unité de test.

b) *Milieu.* — Pour la culture préliminaire des cellules en bouteille ainsi que pour les dilutions des cellules et du virus, nous

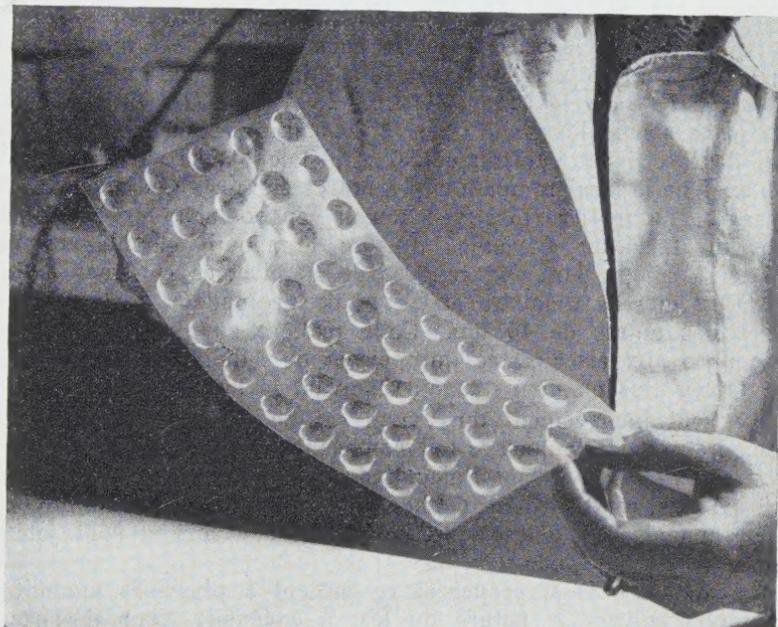


FIG. 1.

employons un milieu composé pour 50 p. 100 soit de la solution Connaught 199 [5], soit du milieu à l'hydrolysat de caséine récemment proposé [6] et pour le reste de 47 p. 100 de solution saline de Hanks complétée avec 3 p. 100 de sérum de cheval.

c) *Virus.* — Pour les séroneutralisations de la poliomyélite, nous employons les trois souches types adaptées à la culture *in vitro* (souches Mahoney, MEF1 et Saukett). Dans les essais rapportés ci-après, nous avons également employé la souche de virus Mengo qui nous a servi à de précédents examens [7]. Toutes ces souches sont maintenues en stock, titrées à — 70°.

Elles sont diluées directement avant l'usage de façon à obtenir

dans 1 goutte calibrée à 0,025 ml un titre de 100 DIC₅₀ pour culture en tube.

Des pipettes calibrées [8] de même dimension sont utilisées pour doser les autres constituants du test : dilution du sérum et du milieu et enfin suspension cellulaire.

d) *Plaques en matière plastique.* — Le matériau employé pour la réalisation des plaques doit répondre à différentes caractéristiques : il doit en particulier être transparent, étanche et peu déformable à la température de l'étuve et surtout se montrer dépourvu de toxicité pour les cellules en culture.

Après de très nombreux essais nous avons arrêté notre choix sur une matière plastique nouvelle constituée par un film de chlorure de polyvinyl non plastifié, le Vynan (1). Ce matériau se prête particulièrement bien à la culture cellulaire, car les cellules s'y fixent immédiatement et s'étalent à sa surface mieux qu'elles ne le feraient sur tous les autres supports que nous avons essayés. La matière plastique fournie en rouleaux est façonnée par un fabricant spécialisé (2) qui l'emboutit en plaques de 25 × 12 cm portant cinq rangées de 10 alvéoles coniques ayant 10 à 12 mm de diamètre et 6 mm de profondeur, distantes les unes des autres de 10 mm. Cette matière souple est aisément découpée aux ciseaux, ce qui permet de subdiviser les plaques en unités plus ou moins grandes suivant le test à exécuter.

Le seul inconvénient du Vynan est de ne pas résister à la température de l'autoclave : il est néanmoins facilement stérilisé soit par immersion dans l'alcool, soit par exposition aux rayons ultraviolets, cette dernière méthode étant celle que nous employons couramment. Les plaques ne servent qu'une fois et sont jetées après usage.

Les plaques ainsi préparées se prêtent à plusieurs modalités d'emploi suivant la nature du test à exécuter. Nous décrirons ci-après l'une des techniques qui a servi aux recherches rapportées dans cette note et pour lesquelles on emploie une surface de 12 × 10 cm comprenant 16 alvéoles.

e) *Exécution du test.* — On dépose sur une lame de verre carrée de 18 cm stérile, la plaque en matière plastique (stérilisée préalablement à l'U.V.). Avant de le faire nous prenons soin de mouiller légèrement la surface du verre à l'eau physiologique, ce qui sert à assurer une continuité optique entre la lame de verre et le fond des alvéoles et à réaliser rapidement une chambre humide une fois le test mis en route.

Nous déposons ensuite dans les alvéoles par rangées verticales

(1) Fabriqué en France par la Société La Cellophane, 110, boulevard Haussmann, Paris-8^e.

(2) Etablissements Ch. Nicolle, 28, rue d'Arcueil, Gentilly (Seine).

et à raison de I goutte, successivement les dilutions des trois virus de la poliomyélite ; la quatrième rangée étant réservée au témoin sérum reçoit I goutte de milieu. On dépose aussitôt les dilutions de sérum par rangées horizontales (habituellement deux rangées par dilution).

On recouvre la plaque d'un couvercle de boîte de Petri de 14 cm de diamètre ; on agite légèrement et on remet le tout à l'étuve pendant quarante-cinq minutes. Puis, après avoir ajouté dans chaque alvéole I goutte de suspension cellulaire préparée comme nous l'avons indiqué et III gouttes de milieu, nous scellons le couvercle de la boîte de Petri contre la lame de verre à la paraffine. Il est important d'employer une paraffine additionnée de 10 p. 100 de cire d'abeille très chaude contre une surface de verre sèche.

On lit les résultats après soixante-douze à quatre-vingt-seize heures en retournant la lame avec la plaque et en inspectant au microscope les fonds des alvéoles visibles à travers la lame-support.

Au cours de cette opération, les alvéoles se vident et leur contenu s'écoule dans le couvercle de la boîte de Petri, ce qui n'empêche aucunement la lecture qui doit pourtant être définitive à ce moment.

Dans les alvéoles témoins sans virus et sans sérum humain on observe vers le troisième jour une nappe épithéliale uniforme, surtout au centre de l'alvéole. Les témoins avec sérum humain sans virus présentent un aspect identique. Il faut cependant remarquer qu'en présence de certains sérum humains à faible dilution (moins de 1:8) les cellules peuvent montrer quelques signes de souffrance : elles ont tendance à s'arrondir ou à devenir granuleuses. Avec un peu d'habitude, cet aspect est très facile à distinguer de la dégénérescence spécifique due au virus.

Dans les alvéoles avec virus et sans sérum, ou avec sérum ne contenant pas d'anticorps, toutes les cellules sont détruites au bout de trois jours. Cette destruction est si totale qu'on retrouve à peine quelques débris cellulaires et l'alvéole apparaît comme vide, les cellules étant détruites d'emblée avant même de donner une croissance appréciable.

Dans les cas limite où des anticorps sont présents en quantité trop faible pour neutraliser le virus entièrement, la destruction au troisième jour peut ne pas être aussi avancée et généralisée.

L'expérience a montré qu'au quatrième jour le virus se manifeste partout où il est présent, même si on ne doit voir que quelques plages nécrotiques isolées. Autrement dit, on observe à ce moment, soit l'absence pratiquement totale de cellules qui correspond à une infection de toutes les cellules intervenue d'emblée par un excès de virus en l'absence d'anticorps, soit,

dans les cas limite, des images de dégénérescence spécifique d'une nappe cellulaire constituée, images qui correspondent à une neutralisation partielle du virus.

Le titrage d'anticorps sériques vis-à-vis des trois types du virus poliomyélitique se déroule de la même façon avec cette seule différence que des dilutions successives de sérum sont mises en présence d'une suspension unique de virus.

Pour titrer le virus, on procède d'une façon analogue en mettant I goutte des dilutions successives du virus dans les alvéoles et en y ajoutant I goutte de suspension cellulaire et IV gouttes de milieu. La lecture définitive se fait le cinquième jour.

RÉSULTATS.

Pour apprécier la valeur pratique de la méthode précédemment décrite, nous avons effectué en parallèle les titrages d'anticorps et les titrages de virus, soit sur nos plaques de matière plastique, soit sur des tubes de culture de cellules rénales de singe préparées

TABLEAU I. — Taux d'anticorps spécifiques dans les sérums de lapins.

Lapins	Type de virus	Méthode employée	Résultats des lectures								
			Dilutions des sérums								
			1:20	1/40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	
"85" "86" et "511"	III	Plaques	N N	N N	N N	N N	N N	N +	++	++	++
		Tubes	N N	N N	N N	N N	N N	++	++	++	++
"585"(1)	II	Plaques	N N	N N	N N	N N	N N	++	++	++	++
		Tubes	N N	N N	N N	N N	N N	++	++	++	++
"85"	III	Plaques	N N	N N	N N	N +	++	++	++	++	++
		Tubes	N N	N N	N N	++	++	++	++	++	++
"53" et "51"	I	Plaques	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N
		Tubes	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N	N N
"585"(2)	II	Plaques	N N	N N	N N	N N	N N	N +	++	++	++
		Tubes	N N	N N	N N	N N	N N	++	++	++	++

Type de virus : Le même virus est utilisé pour l'immunisation et le test.
Résultats des lectures : N culture normale, + culture détruite par le virus.

Comme on le voit, les résultats des 5 titrages sont pratiquement identiques pour les deux méthodes.

selon les méthodes usuelles [4]. Dans le cas de la séroneutralisation, chaque résultat porté dans les tableaux qui suivent correspond à la lecture effectuée soit sur deux alvéoles de la plaque, soit sur deux tubes de culture.

TABLEAU II. — Résultats comparatifs des titrages des suspensions virulentes effectués par les deux méthodes.

VIRUS	MÉTHODE	DILUTIONS DE VIRUS										TITRE obtenu
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
MEF 1 lot du 21-11-55	plaques	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	NN	10 ^{-5,5}	
	tubes	++	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	10 ^{-4,75}	
MAHONEY lot du 4-7-54	plaques	++	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	10 ^{-4,25}	
	tubes	++	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	10 ^{-4,75}	
SAUKETT lot du 3-2-56	plaques	++	++	++	++	++	++	++	NN	NN	10 ^{-6,5}	
	tubes	++	++	++	++	++	++	++	++	NN	10 ^{-6,75}	
MAHONEY lot du 3-1-55	plaques	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	NN	10 ^{-4,5}	
	tubes	++	++	++	++	NN	NN	NN	NN	NN	10 ^{-4,25}	
SAUKETT lot du 5-7-55	plaques	++	++	++	++	++	++	++	NN	NN	10 ^{-6,75}	
	tubes	++	++	++	++	++	++	++	NN	NN	10 ^{-6,75}	
MENGO 48° p. lot du 8-4-55	plaques	++	++	NN	10 ^{-2,5}							
	tubes	++	++	NN	10 ^{-2,75}							

Dans le cas des titrages de virus, le nombre des tubes ou des alvéoles entrant en jeu a été de quatre pour chaque dilution.

Nous avons, dans le cadre de ces essais, pratiqué 147 séro-neutralisations parallèlement sur plaques et sur tubes, dont 53 ont donné des résultats négatifs identiques par les deux méthodes ; les sérum positifs ont donné 88 résultats (présence d'anticorps) identiques dans les deux méthodes ; dans 6 cas seulement la

neutralisation est apparue complète à la dilution limite dans les deux tubes, alors qu'avec la méthode des alvéoles elle était positive dans un tube sur deux.

A titre d'exemple, le tableau I rapporte les résultats parallèles obtenus dans le titrage des anticorps de sérum de lapins immunisés contre la poliomyélite. Le tableau II montre, de même, les résultats des titrages comparatifs de différents lots de virus polio-mélique et d'un lot de virus Mengo.

Si l'on admet, dans ce dernier cas, que l'erreur inhérente à la méthode de calcul du titre est de $\pm 0,25$ log., les résultats paraissent d'une concordance satisfaisante.

CONCLUSION.

Il ressort de nos essais que la comparaison des séroneutralisations et des titrages de virus par la méthode classique des tubes d'une part, par notre microméthode d'autre part, donne des résultats pratiquement équivalents, les différences de résultats obtenus par les deux méthodes ne dépassant pas les fluctuations normales observées dans la pratique de chacune d'elles.

La microméthode sur plaque en matière plastique présente, du point de vue pratique, des avantages considérables. Elle apporte une énorme économie de matériel, de temps et de main-d'œuvre. Une seule culture de cellules sensibles dans une bouteille de 1 l remplace environ 500 cultures individuelles en tubes avec tout ce que leur préparation comporte de manipulations pour la mise en culture, le renouvellement du milieu, le bouchage des tubes et les risques de contamination qui leur sont attachés. Elle emploie environ cinq fois moins de cellules que la méthode des tubes et beaucoup moins encore que la méthode colorimétrique, qui exige, pour mettre en évidence un changement de pH, un minimum de 20 à 30 000 cellules par unité de test. Elle permet l'observation directe de l'effet cytopathogène et l'interprétation plus précise des résultats tangents ou douteux, tout en éliminant les causes d'erreurs qui pourraient être dues à des actions toxiques ou à des contaminations bactériennes ou fongiques. De ce point de vue elle est incomparablement plus précise que la méthode colorimétrique.

Sous sa forme présente, notre méthode se prête parfaitement à des applications pratiques pour le titrage, non seulement du virus poliomyélite, mais d'autres virus manifestant des effets cytopathogènes, en particulier le virus Mengo, celui de l'herpès et les différents virus APC.

Enfin, d'autres modalités d'emploi des mêmes plaques de matière plastique actuellement en cours d'essai seront prochainement rapportées.

SUMMARY.

The technique described is based upon the same principles as the micromethod previously described by the authors. They utilize thin sheets of a new polyvinyl, which are sterilized by U.V. and discarded after use.

The results obtained with this new technique and with the classical test tube-method have been compared. The results of 141 neutralisations out of 147 were identical with both methods ; in 6 cases, a slight difference was observed. The titration of antibodies and virus (12 experiments) have also given concording results.

The new method allows a considerable gain of time, and cellular material.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 693.
- [2] MELNICK (J. L.) et OPTON (E. M.). *Bull. O. M. S.*, 1956, **14**, 129.
- [3] BARSKI (G.), SOUZA (P. DE), ENDO (M.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 576.
- [4] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
- [5] MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 1.
- [6] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (PH.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
- [7] BARSKI (G.) et LAMY (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 318.
- [8] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.), DELPY (J.) et ARTZET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 684.

LE PHÉNOMÈNE DE " RAPPEL " PAR INJECTION
DE SALIVE OU DE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN
DE SUJETS ATTEINTS D'OREILLONS A DES COBAYES
IMMUNISÉS CONTRE CETTE INFECTION

(ESSAI DE MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC RAPIDE
DE L'INFECTION OURLIENNE CHEZ L'HOMME. 2^e NOTE.) (*)

par R. SOHIER, F. CHALLUT et Y. CHARDONNET. (**)

(*Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Lyon*)

Il est possible de faire apparaître chez le cobaye par instillation nasale de produits contenant le virus des oreillons (liquide allantoïque d'œuf infecté artificiellement ou salive d'homme atteint de parotidite ourlienne) des anticorps fixant le complément. En outre, lorsque chez ces animaux le titre des anticorps est redevenu assez bas, l'instillation nasale des mêmes produits provoque, par un phénomène dit « de rappel » (ou anamnestique, ou « booster effect » des Anglo-Saxons) une augmentation significative et assez rapide des anticorps décelables par la réaction de fixation du complément.

Depuis que nous avons rapporté nos premières constatations [1] comparables, du moins en ce qui concerne la production d'anticorps lors d'une primo-infection, à celles faites chez le cobaye après inoculation intra-oculaire [2] ou chez le hamster par voie nasale [3], nous avons procédé à de nombreux essais. L'ensemble des résultats obtenus comportant une étude du développement de l'immunité chez le cobaye fera l'objet d'un autre mémoire et nous nous limiterons ici à l'étude du phénomène « de rappel » et des applications qu'il peut comporter pour le diagnostic rapide des oreillons.

On pouvait se demander s'il n'était pas possible d'obtenir, chez l'animal inoculé avec un produit pathologique, une réponse signifi-

(*) Travail effectué en partie grâce à une donation de l'Association pour le Développement de la Recherche Médicale Française.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mai 1956.

ficative dans des délais assez courts pour fournir des éléments diagnostiques utilisables, mais les anticorps n'apparaissaient, chez 8 animaux inoculés par voie nasale ou intracardiaque, qu'à partir du neuvième jour, le maximum étant atteint au douzième jour.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes adressés à des cobayes précédemment immunisés et chez lesquels on a tenté de provoquer la stimulation des anticorps dans des délais plus courts.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Animaux immunisés : 23 cobayes (300 à 450 g) ont été inoculés, dont 15 par voie nasale, 6 par voie intradermique et 2 par voie sous-cutanée avec des liquides allantoïques infectés par la souche BOS (1) employés purs ou dilués, les volumes variant de 0,5 ml à 1 ml.

Le contrôle du titre des anticorps fixant le complément après cette primo-inoculation était fait au douzième jour. Les titres obtenus ont été les suivants (2) : inoculation nasale : une fois 32, une fois 64, une fois 256, onze fois 512 et une fois 1024 ; voie intradermique : une fois 8, une fois 16, quatre fois 32 ; voie sous-cutanée : une fois 8 et une fois 512.

On a utilisé aussi une fois un cobaye (n° 322) ayant reçu deux injections intrapéritonéales à huit jours d'intervalle de vaccin formolé, préparé avec la souche BOS et dont le titre d'anticorps maximum avait été 32. La diminution du titre des anticorps fixant le complément était suivie au moyen de prélèvements périodiques effectués en général après trente, quarante-cinq, soixante et quatre-vingt-dix jours, puis tous les deux ou trois mois, certains animaux ayant été suivis plus d'un an.

Réaction de fixation du complément : Sérum des cobayes : prélevé par section d'une veine de la patte antérieure ou postérieure permettant de prélever 3 à 4 ml de sang, sérum conservé congelé à — 30°. Antigène : liquide allantoïque d'œuf infecté avec la souche BOS, puis formolé à 0,5 p. 1 000, conservé à 4°. On n'utilisait que les liquides titrant 2 unités-antigène à la dilution du 1/2. La plupart des contrôles ont été effectués avec deux antigènes (Ag 45 et Ag 75) ; technique : micro-méthode en tubes [4], fixation à 0-4°.

Inoculation des produits pathologiques à expertiser aux animaux immunisés : Il s'agissait soit de salive parotidienne de malades

(1) Souche isolée dans notre laboratoire en 1952 de la salive parotidienne recueillie au deuxième jour d'une parotidite et adaptée au développement dans la cavité allantoïque au quatorzième passage.

(2) Indiqués par le dénominateur de la dilution fixant le complément.

atteints d'oreillons, recueillie au sialo-préleveur (3) le plus tôt possible après le début de l'infection et au maximum le quatrième jour, et placée rapidement au congélateur à — 25° — 30°, soit de liquide céphalo-rachidien de méningite ourlienne (un cas), mais conservé à — 7° — 10°.

Toutes les fois que cela a été possible, nous avons vérifié, en même temps que nous procédions à l'inoculation à l'animal immunisé, la présence du virus des oreillons par inoculation dans l'amnios (3) d'œufs embryonnés de 7 jours (3 passages en cas d'absence d'hémagglutination lors des deux premiers).

Les animaux précédemment immunisés, et qui devaient subir l'inoculation du produit pathologique, étaient saignés et on n'utilisait pour cette saignée que ceux dont les anticorps fixant le complément étaient retombés à un titre égal ou inférieur à 4 (plus rarement à un titre plus élevé, maximum 16).

L'inoculation a été faite par diverses voies, d'abord intranasale, puis intradermique ou intracardiaque, dans le but de préciser la méthode qui provoquerait le mieux l'augmentation rapide et significative du titre des anticorps. A ce propos, a été essayée, d'ailleurs sans résultat meilleur, l'inoculation répétée de petites doses du produit infecté, soit au même point, soit en divers points.

Les prélèvements de sang étaient faits plusieurs fois entre le quatrième et le douzième jour. Le sérum était congelé à — 30° et l'appréciation de l'augmentation du titre des anticorps était toujours faite en engageant dans la même réaction le sérum pris avant inoculation et les suivants.

RÉSULTATS OBTENUS.

Nous distinguerons ceux concernant des produits pathologiques dans lesquels la présence du virus était prouvée par culture, et ceux pour lesquels ou bien le virus n'a pu être recherché, ou bien la culture dans l'œuf n'a pu être obtenue.

1^o PRODUITS PATHOLOGIQUES CONCERNANT LE VIRUS DES OREILLONS.
— Nous avons utilisé les salives des malades Pac..., Sca..., Sev... prélevées respectivement au premier, deuxième, troisième jour de la maladie.

Les essais seront groupés en deux catégories : ceux qui ont permis d'obtenir une augmentation significative du titre des anticorps en quatre à sept jours, et ceux pour lesquels elle n'a été manifestée qu'entre le huitième et le douzième jour.

(3) On trouvera cette technique, comme d'autres qui ont été utilisées pour cette étude, dans notre livre P. Lépine et R. Sohier [5].

a) *Augmentation significative des anticorps en quatre à sept jours* : Résultats exposés dans la figure 1. On constatera que la réponse était significative en quatre jours après inoculation par voie nasale (cob. 198), intracardiaque (cob. 322), et en six jours après inoculation intradermique (cob. 299). On doit noter ici également une augmentation légère, mais nette, pour le cobaye 270 (voie intracardiaque) titre ≤ 4 puis 8 au quatrième

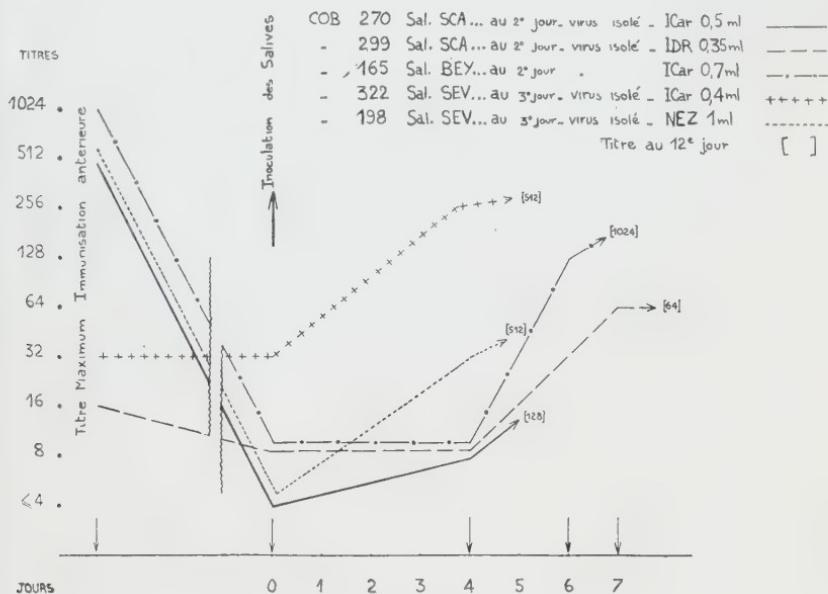


FIG. 1.

jour, dont la valeur se trouvait confirmée par l'ascension importante du titre les jours suivants.

Il semblerait donc, d'après ces faits, que diverses voies d'inoculation peuvent être employées, mais il convient de noter l'intérêt qu'il y aurait à poursuivre d'autres essais par voie intracardiaque.

Ces résultats doivent être comparés à ceux obtenus dans des délais un peu plus longs.

b) *Augmentation du titre des anticorps en huit à douze jours* : Les résultats ont été condensés et résumés dans les figures 2, 3, 4 et 5.

Il apparaît qu'avec la salive Sca... 5 cobayes ont répondu par l'élaboration d'anticorps au plus tard au douzième jour. Un seul

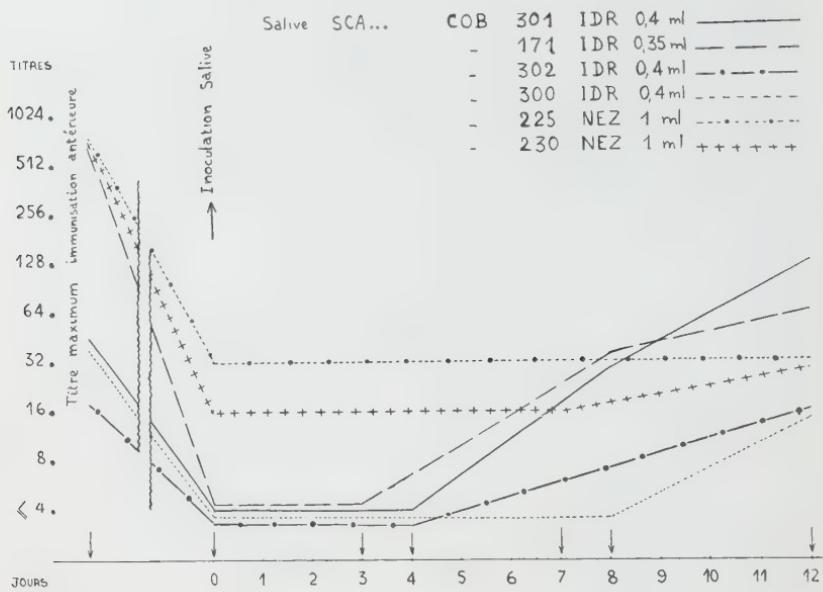


FIG. 2.

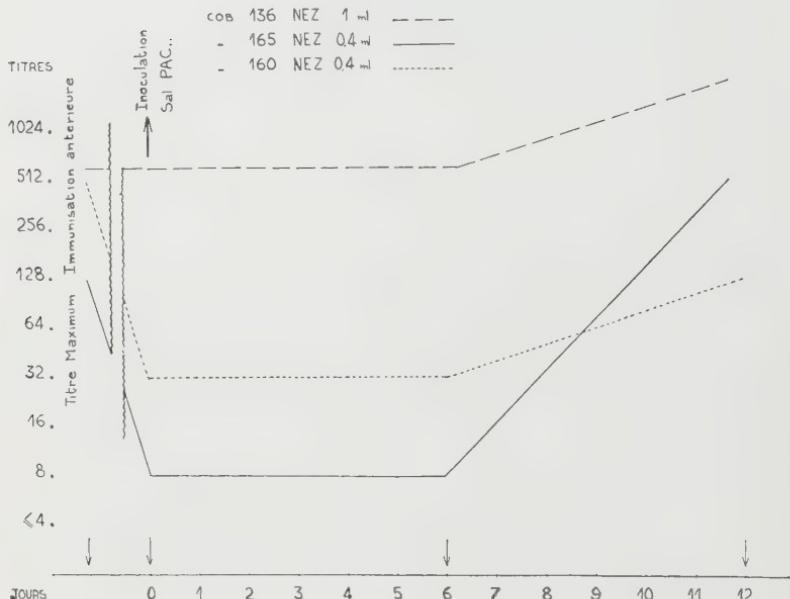


FIGURE 3

n'a pas produit d'anticorps (voir fig. 2). La salive Pac... inoculée à 3 cobayes a toujours provoqué une élévation du titre des anticorps (voir fig. 3). Enfin, la salive Sev... a donné des résultats positifs chez les quatre animaux auxquels elle avait été inoculée (voir fig. 4).

2^o PRODUITS PATHOLOGIQUES POUR LESQUELS LA PRÉSENCE DU VIRUS N'A PAS ÉTÉ RECHERCHÉE OU N'A PAS ÉTÉ CONSTATÉE. — Il ne sera tenu compte que de ceux prélevés dans des conditions

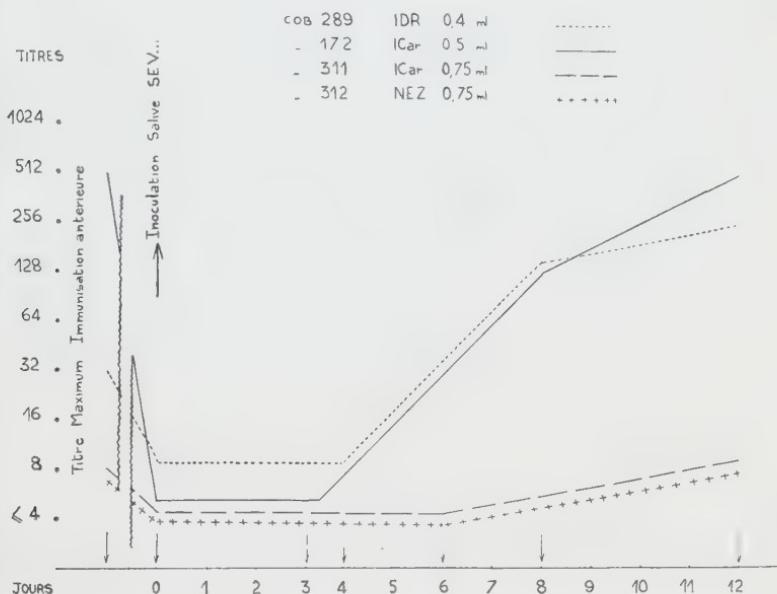


FIG. 4.

telles qu'on pouvait admettre la présence du virus d'après les documents recueillis à ce jour par de nombreux observateurs et par nous-mêmes au cours de l'infection ourlienne de l'homme.

a) *Salive parotidienne* : Les essais ont été faits avec la salive Bey... recueillie au deuxième jour d'une parotidite typique et qui s'est accompagnée d'une élévation nette des anticorps fixant le complément dans le sang du malade (0 au cinquième jour et 128 au dix-huitième jour). Cette salive a provoqué une ascension significative, rapide une fois (voir fig. 1, cob. 165 [voie intracardiaque] : le titre passe de 8 à 128 en six jours), et plus lente trois fois (cob. 183, voie intracardiaque, 0-8 en huit jours ;

cob. 160 et 193, voie nasale, respectivement 8-256 et 128-1024 au douzième jour).

b) *Liquide céphalo-rachidien*: Un seul essai a pu être effectué car nous n'avons pas observé dans notre service de méningite ourlienne depuis dix-huit mois et avons dû demander à des collègues de nous procurer ces produits. Avec le L. C.-R. du malade Bac... (méningite ourlienne primitive), nous avons tenté d'isoler le virus par culture après une conservation de vingt-neuf jours à — 7 — 10° et avons échoué. Cependant, le L. C.-R. inoculé à des

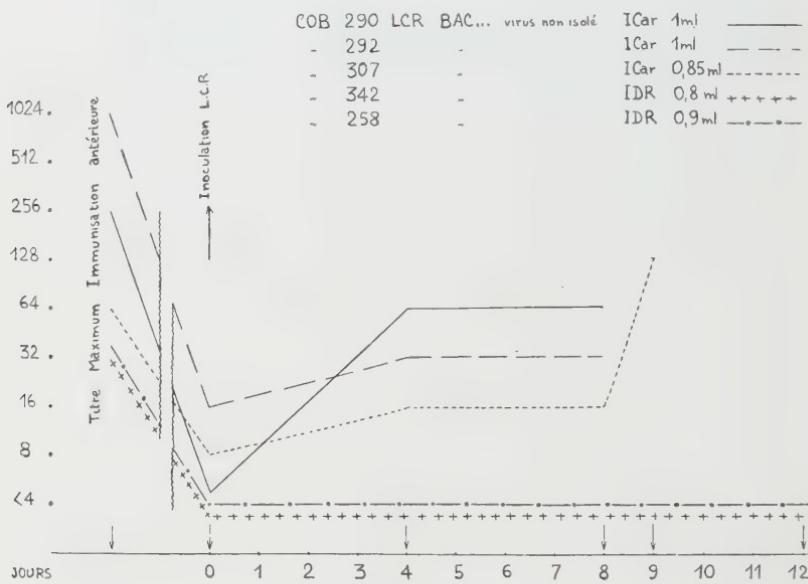


FIG. 5.

cobayes précédemment immunisés a permis d'obtenir les résultats exposés sur la figure 5. On constatera que le cobaye 290 a répondu en quatre jours à l'inoculation de L. C.-R. par une augmentation significative du titre des anticorps fixant le complément.

En se limitant à des faits d'intérêt pratique immédiat pour le diagnostic de l'infection ourlienne et de façon plus générale d'autres affections à virus, telles que la grippe (pour laquelle nous avons obtenu des résultats intéressants) et sans entrer dans l'étude détaillée du développement de l'immunité contre le virus des oreillons chez le cobaye qui a comporté de nombreux ani-

maux et fera l'objet d'un autre exposé, on peut déjà attirer l'attention sur quelques données.

Les délais d'obtention d'une réponse sont indiscutablement intéressants lorsqu'ils sont réduits à quatre ou même sept jours, si l'on veut bien tenir compte de ceux exigés dans la pratique courante soit pour l'isolement du virus par culture (avec cette réserve que les cultures de tissus permettront peut-être d'aller plus vite), soit pour les méthodes indirectes sérologiques. On voudra bien se reporter à ce sujet à l'essai critique que l'un de nous a récemment présenté [6]. Quoi qu'il en soit, une réponse en huit jours constitue une donnée d'intérêt pratique réel.

Il convient donc de déterminer les conditions dans lesquelles elle peut être obtenue, lesquelles dépendent (ce qui complique un peu le problème) de facteurs divers : comportement individuel des animaux, rôle de la primo-infection et, pour celle-ci, voie d'introduction du virus vivant ou inactivé (à ce propos, des différences notables peuvent être constatées comme dans les intéressantes recherches récentes de Kirber et coll. [7] sur l'immunisation par voie oculaire), le titre convenable des anticorps au moment de l'inoculation du produit à expertiser, la voie d'introduction de ce produit. Certaines d'entre elles ont été précisées, mais d'autres doivent faire l'objet de nouvelles investigations.

RÉSUMÉ.

L'injection de produits pathologiques provenant de malades atteints d'oreillons, qu'il s'agisse de salive parotidienne ou de liquide céphalo-rachidien, effectuée par diverses voies (intranasale, intradermique, intracardiaque), provoque chez des cobayes inoculés préalablement avec des virus ourliens et ayant développé des anticorps fixant le complément dont on a laissé le titre redevenir apparemment nul ou très faible, une augmentation significative de ces anticorps.

Celle-ci peut être obtenue en quatre à sept jours et presque toujours en huit jours.

Cette méthode paraît comporter des applications pratiques pour le diagnostic rapide de l'infection ourlienne et pourrait être appliquée à d'autres affections à virus de l'homme.

SUMMARY.

Guinea-pigs are inoculated with mumps virus. They develop complement-fixing antibodies. After a certain time, the titre of these antibodies becomes null or very low. These guinea-pigs are then inoculated with pathological material from mumps

patients (parotid saliva or cerebro-spinal fluid) by different ways (intranasal, intracutaneous, intracardiac). The titre of the complement-fixing antibodies rises then significantly, sometimes in 4 to 7 days, always within 8 days.

This method might be useful for a rapid diagnosis of mumps infection and might also be applied to other virus diseases of man.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOHIER (R.), CHALLUT (F.) et CHARDONNET (Y). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 113.
- [2] BOLIN (V. S.) et LEYMASTER (G. R.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **79**, 7.
- [3] BURR (N. M.) et NAGLER (F. P.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1953, **83**, 714.
- [4] SOHIER (R.), PEILLARD (M. M.), GINESTE (J.) et FREYDIER (J.). *Ann. Biol. clin.*, 1956, **14**, 281.
- [5] LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). *Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*. Masson, édit., Paris, 1954.
- [6] SOHIER (R.). *Sem. Hôp. Paris (Pathologie-Biologie)*, 1956, **32**, B 167 P.
- [7] KIRBER (H. P.) et KIRBER (M. W.). *Arch. Ophthal.*, 1954, **51**, 832.

SUR LE MODE D'ACTION DU SÉRUM ANTIRÉTICULAIRE (SÉRUM DE BOGOMOLETZ)

par J. LOISELEUR (*)

(Institut Pasteur. Service de Chimie-Physique)

Metchnikoff, le premier, a envisagé en 1904 la possibilité de stimuler la phagocytose par l'injection d'une faible dose d'un sérum spécifique, une forte dose devant au contraire exercer une action inhibitrice. Cette exaltation d'une fonction cellulaire a été réalisée par Bogomoletz en 1938. Se basant sur l'importance du système réticulo-endothélial, Bogomoletz en a préparé un sérum spécifique, dans le but de provoquer une excitation de ce système et d'enraîner ainsi une sorte de « rajeunissement » général des tissus.

Parmi les effets attribués à ce sérum (1), il est établi qu'il active la cicatrisation des plaies cutanées [1, 2, 3], la réparation des fractures osseuses [4, 5] et la culture des tissus et des fibroblastes [6].

Or, dans deux phénomènes, la cicatrisation des plaies expérimentales d'une part et la diffusion intradermique du bleu trypan d'autre part, il apparaît une analogie si étroite entre les effets de ce sérum et ceux de l'hyaluronidase qu'il semble en résulter une explication du mode d'action du sérum.

(1) Il n'est pas fait mention ici d'une action du sérum efficace sur l'état général de l'organisme, car l'expérimentation conduite dans ce sens, en collaboration avec M. Nicol à l'Institut Pasteur de Garches, a abouti à un résultat totalement négatif. On sait que, chez les chevaux, le taux des anticorps dépend d'un facteur individuel : certains animaux sont de bons producteurs et donnent un sérum à titre élevé, d'autres au contraire donnent toujours un sérum faible. La mesure du taux des anticorps constitue ainsi un test très sensible et très précis pour apprécier l'action générale du sérum antiréticulaire. Avec Nicol, nous avons donc préparé, sur des moutons, un sérum antiréticulaire de Cheval et nous avons traité des chevaux producteurs de séums antigrippitaire ou antitétanique, en choisissant, pour chaque cas, des lots de bons et de mauvais producteurs. Or, le traitement n'a jamais entraîné la moindre variation dans le taux des anticorps.

(*) Manuscrit reçu le 24 mai 1956.

Notons tout de suite, que l'expérimentation a porté exclusivement sur la souris [7] et le rat [8].

I. — ACTION DU SÉRUM ANTIRÉTICULAIRE SUR LA CICATRISATION.

La plaie expérimentale est obtenue en délimitant d'abord, dans la région dorso-lombaire, un cercle avec un emporte-pièce. Le diamètre de ce cercle est égal à 10 mm pour la souris et à 25 mm pour le rat. On découpe aux ciseaux, sous anesthésie au rectanol, la rondelle de peau correspondante. Dès le premier jour, la plaie est recouverte d'un exsudat jaunâtre qui forme croûte après deux jours environ. Cette croûte s'élimine entre le dix-septième et le vingtième jour. Chez l'animal qui ne subit aucun traitement, la cicatrisation est achevée après trente jours environ. La forme géométrique de la cicatrice facilite la mesure de la surface et l'établissement des graphiques.

Dans cette technique, les plaies ne sont pas stériles. Il en résulte que les lois de la cicatrisation ne sont pas vérifiées : des souris de 4 mois présentent, après vingt et un jours, le même état de cicatrisation que des souris âgées de 24 mois. Néanmoins, la vitesse de cicatrisation reste très sensiblement constante et un lot d'animaux traités de la même façon ne présente pas d'écart notables.

Sensibilité de la vitesse de cicatrisation à différents stimulus. — L'ensemble de 52 groupes d'expériences montre que la vitesse de cicatrisation est extrêmement sensible à toute une série d'agents. Certains de ces agents agissent en *traitement préventif*, l'animal étant préparé par une série d'injections pendant les trois semaines qui précèdent l'opération ; d'autres substances, le sérum en particulier, permettent un *traitement curatif*, pratiqué postérieurement au traumatisme.

Déjà le simple taitement préventif de la souris par des extraits aqueux de tissus de souris (tissu réticulaire ou tissu embryonnaire) accélère notablement la cicatrisation. Cet extrait aqueux ne contient qu'une très faible concentration en antigène et le résultat devient plus marqué quand on introduit, directement dans le péritoïne, ces tissus à l'état broyé.

La sérothérapie spécifique permet des traitements préventif et curatif. Les sérums sont préparés avec le lapin, en injectant directement, dans sa veine, le tissu expérimenté, préalablement dilacéré. Ces injections sont en général bien tolérées et entraînent rarement des accidents.

Les sérums ainsi préparés possèdent une action constante sur la cicatrisation. Le sens de cette action dépend de la nature du tissu choisi comme antigène. Certains antigènes provoquent la

formation d'un sérum qui active la cicatrisation ; pour d'autres, le sérum devient inhibiteur. Dans tous les cas, la spécificité d'origine intervient rigoureusement : le sérum, préparé avec des tissus de souris, est inactif sur le rat, et réciproquement.

L'action des divers antigènes peut être résumée de la façon suivante :

1° En traitement curatif, les sérums antiréticulaire et anti-embryonnaire sont les plus actifs ;

2° En traitement préventif, le sérum antiplacentaire est le plus actif ;

3° Dans les deux modes d'application précédents (traitement préventif et traitement curatif), le sérum doit être employé à une dilution convenable ;

4° Le sérum des lapins, préparés avec un mélange de glandes à sécrétion interne (thyroïde, hypophyse, surrénale) ou avec l'une seule de ces glandes, exerce toujours un effet inhibiteur.

Cet exposé se borne à l'étude du sérum antiréticulaire.

Préparation du sérum antiréticulaire. — Voici le mode de préparation de ce sérum.

On prélève à un rat jeune, d'un poids compris entre 75 et 100 g, 6 ganglions cervicaux, la moelle des quatre os longs, 100 mg de thymus et 100 mg de rate.

On broye ces tissus avec un pilon, sur une passoire métallique à mailles très fines. La bouillie qui sort de la passoire est à nouveau broyée dans un mortier d'agate, puis mise en suspension dans 5 cm³ de NaCl à 7 p. 1 000.

Cette suspension tissulaire est injectée, aussitôt après sa préparation, dans la veine du lapin. Le poids de l'animal doit être compris entre 2 et 2,5 kg. Cinq lapins sont traités simultanément de façon à parer à tout accident et aussi pour remédier aux variations individuelles. A cet effet, on mélange les sérums des 5 animaux, lors du prélèvement final.

La préparation des animaux est effectuée avec les doses et la cadence suivantes :

1 ^{er} jour, injection intraveineuse de 0,25 cm ³			
4 ^e	"	"	0,25 "
6 ^e	"	"	0,5 "
8 ^e	"	"	0,5 "
10 ^e	"	"	0,75 "
12 ^e	"	"	0,75 "
14 ^e	"	"	1 "
16 ^e	"	"	1 "
18 ^e	"	"	1,5 "
20 ^e	"	"	1,5 "

Le treizième jour après la dernière injection, on prélève la totalité du sang. Le sérum est conservé à la glacière en présence

d'un cristal de thymol. Le sérum conserve son activité pendant deux mois environ.

Action du sérum antiréticulaire sur la cicatrisation. — Le traitement commence aussitôt après l'ablation de la rondelle de peau, en employant toujours une dilution à 5 p. 100 du sérum :

Sérum pur	0,25 cm ³
NaCl à 7 p. 1 000	4,75 cm ³

Cette dilution est injectée dans le muscle de l'animal opéré, suivant les doses et la cadence suivante :

1 ^{er} jour après l'opération	0,05 cm ³
2 ^e jour après l'opération	0,1 cm ³
3 ^e jour après l'opération	0,15 cm ³
4 ^e jour après l'opération	0,2 cm ³
5 ^e jour après l'opération	0,2 cm ³
6 ^e jour après l'opération	0,2 cm ³

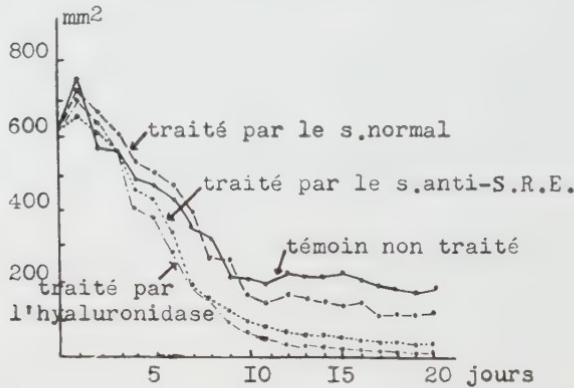


FIG. 1. — Cicatrisation des plaies expérimentales du rat. En ordonnée, la surface de la cicatrice ; en abscisse, le temps écoulé depuis l'opération.

L'expérience montre qu'il n'y a pas intérêt à poursuivre le traitement pendant une période plus prolongée.

Le traitement indiqué ci-dessus augmente la vitesse de la cicatrisation. Cette augmentation est plus sensible dans les premiers jours du traitement. Par exemple, dans une expérience portant sur 20 rats (10 témoins, 10 animaux traités), dès le deuxième jour après l'opération, les animaux traités présentent un aspect plus favorable de leurs cicatrices et un meilleur état général. Le quatrième jour, la cicatrice est déjà très en avance par rapport à celles des témoins. Le dixième jour, toutes les croûtes sont tombées, en démasquant une petite cicatrice qui régressera plus

lentement. Les animaux présentent un état général apparent excellent. A la même date, les témoins ont encore conservé leurs grosses cicatrices croûteuses et présentent un aspect moins favorable. La mesure de la surface cicatricielle est effectuée tous les jours ; l'ensemble de l'expérience est représenté par la figure 1, où les surfaces cicatricielles sont portées en ordonnée et, le temps écoulé, en abscisse.

II. — ACTION LOCALE DU SÉRUM ANTIRÉTICULAIRE SUR LA DIFFUSION DU BLEU TRYPLAN.

Pour interpréter cette action du sérum, on peut d'abord remarquer que l'action spécifique au système conjonctif est prépondérante.

Une hypothèse acceptable consisterait à admettre, avec Lassargues et Delaunay [6], que le sérum agit en favorisant la libération de substances possédant les propriétés physiologiques des tréphones.

Beaucoup plus simplement, on peut se demander si ce sérum n'agirait pas directement sur le tissu conjonctif, en provoquant notamment une modification de son état physico-chimique. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience très simple consiste à voir si le sérum est capable de favoriser la diffusion intradermique d'un colorant vital, le bleu trypan par exemple.

Or, l'expérience est positive : elle va mettre en évidence une action locale, directe et immédiate, du sérum antiréticulaire [9].

Rappelons d'abord que des substances diverses (extraits de tumeurs, extraits testiculaires, venins, cultures microbiennes) augmentent la diffusion des colorants vitaux. Duran-Reynals [10] a groupé ces substances sous le nom de « facteurs de diffusion ».

La technique consiste à injecter dans le derme du rat (poids compris entre 210 et 240 g) 0,1 cm³ du mélange, à volume égal, d'une solution à 1 p. 100 de bleu trypan et d'un soluté de NaCl à 7 p. 1 000. Chez ces témoins qui reçoivent ainsi du colorant pur, le colorant diffuse rapidement dans le derme au cours des premières heures consécutives à l'injection.

Cette diffusion fait intervenir plusieurs facteurs : la viscosité de la substance fondamentale conjonctive — viscosité qui commande la vitesse de la diffusion du colorant — et l'adsorption progressive de ce dernier sur les éléments qu'il rencontre au cours de sa diffusion.

La tache colorée circulaire, dont le diamètre peut être mesuré facilement, se stabilise vers la vingtième heure et persiste, sans changement notable, pendant plusieurs jours.

Notons encore que cette diffusion est caractérisée par une régu-

larité et une constance remarquables, si bien que cette technique se prête favorablement à l'étude des facteurs de diffusion.

Si l'on ajoute au bleu du sérum frais de lapin normal, on ne constate qu'une très faible augmentation de la diffusion : 5 p. 100 environ. Or, si l'on répète l'expérience avec le sérum antiréticulaire, on constate une augmentation considérable (fig. 2) qui concerne à la fois la vitesse de la diffusion et le diamètre de la surface occupée par le colorant. Cette action du sérum est si rapide qu'elle exclut toute action générale, et il est remarquable

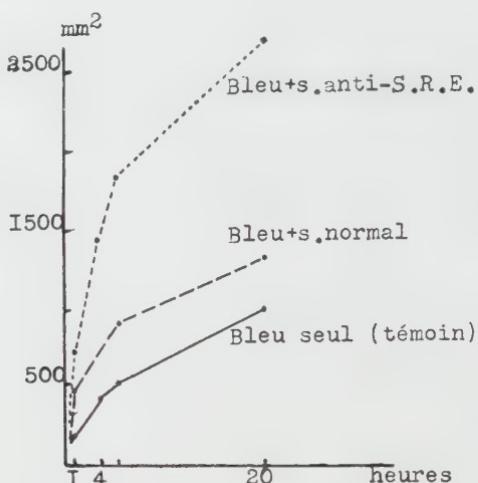


FIG. 2. — Action *locale* du sérum antiréticulaire sur la diffusion intradermique du bleu trypan. Le sérum est injecté en mélange avec le colorant.

En ordonnée, la surface de la tache colorée ; En abscisse, les heures écoulées après l'injection.

de pouvoir attribuer ainsi au sérum antiréticulaire une action locale intéressant directement le tissu conjonctif.

III. — ACTION GÉNÉRALE DU SÉRUM ANTIRÉTICULAIRE SUR LA DIFFUSION DU BLEU TRYPLAN.

L'expérience est encore positive si l'on s'adresse maintenant à l'action générale du sérum. Dans ce cas, l'animal est d'abord préparé, pendant six jours, par des injections intramusculaires de sérum avec les doses qui viennent d'être indiquées. Le septième jour, l'animal subit l'injection intradermique du colorant pur. La figure 3 montre que cette préparation générale par le sérum entraîne une augmentation de la diffusion. Toutefois, dans

cette préparation où le sérum se trouve dilué dans tout l'organisme, l'augmentation de la diffusion n'est pas aussi importante que quand l'action du sérum reste localisée par introduction directe avec le colorant.

IV. — ACTION GÉNÉRALE DE L'HYALURONIDASE SUR LA CICATRISATION.

Voici donc deux expériences, d'ordre différent, la cicatrisation d'une plaie et la diffusion d'un colorant, intéressant toutes deux

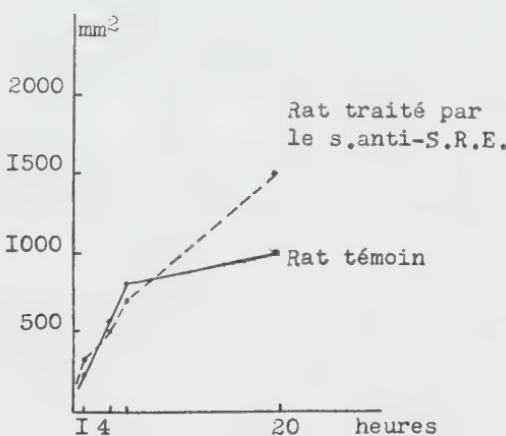


FIG. 3. — Action générale du sérum antiréticulaire sur la diffusion intradermique du bleu trypan.

Le traitement par le sérum est pratiqué pendant six jours. Le septième jour, injection intradermique du colorant seul.

le tissu conjonctif et dans lesquelles se manifeste communément une intervention favorisante du sérum antiréticulaire.

Nous allons abandonner pour le moment le sérum et chercher à reproduire les mêmes effets en faisant appel à un agent différent. L'idée s'impose immédiatement de s'adresser à l'hyaluronidase. On sait en effet que cet enzyme dépolymérise l'acide hyaluronique de la substance fondamentale du tissu conjonctif. Il en résulte évidemment une diminution de sa viscosité et, par voie de conséquence, l'augmentation de son métabolisme particulier. Dès ce moment, on peut se demander s'il en résulte un retentissement sur la vitesse de cicatrisation. Or, l'expérience conduit à un résultat positif.

Des rats, du même poids, subissent l'ablation d'une rondelle

de peau dans les conditions déjà exposées. Une moitié des animaux sert de témoins ; l'autre reçoit, pendant les six premiers jours consécutifs à l'opération, des injections intramusculaires d'une solution d'hyaluronidase. Cette hyaluronidase provient du *Staph. aureus*. Elle est diluée, de la façon suivante, dans du sérum physiologique :

Hyaluronidase	1,25 U. R. V. (unité de réduction de viscosité)
NaCl à 7 p. 1 000	5 cm ³

Cette dilution est utilisée de la façon suivante :

1 ^{er} jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,05
2 ^e jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,1
3 ^e jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,15
4 ^e jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,2
5 ^e jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,2
6 ^e jour après l'opération, injection intramusculaire de	0,2

Dès les premiers jours du traitement, on constate une augmentation de la vitesse de cicatrisation, étroitement comparable à l'action du sérum antiréticulaire. Le graphique est porté sur la courbe 1, à côté de celui du sérum. Pour le moment, nous ne pouvons que constater la similitude remarquable des deux courbes représentatives. Cette similitude est telle que, si l'on voulait envisager l'usage du sérum antiréticulaire pour le traitement des plaies accidentelles (les brûlures des mineurs par exemple), un résultat aussi efficace serait obtenu avec l'hyaluronidase, et — en même temps — d'une façon beaucoup plus simple.

Deux faits rapprochent encore les actions de ces deux agents. D'une part, la dose d'hyaluronidase doit rester modérée, un excès devenant inhibiteur. D'autre part, un effet favorable se manifeste également si l'animal est traité, non plus après l'opération, mais pendant les six jours qui la précèdent. On observe un effet favorable, quoique moins marqué, qu'avec la technique précédente (traitement postérieur à l'opération).

V. — INTERVENTION DE L'HYALURONIDASE SPÉCIFIQUE SUR LA DIFFUSION.

Il est bien connu que l'addition d'hyaluronidase à une injection intradermique de bleu trypan augmente la diffusion du colorant. Il suffit de rappeler les travaux déjà mentionnés de Duran-Reynals [10]. Mais il devient important d'expérimenter maintenant cet enzyme, non plus en action locale, mais en action générale quand l'hyaluronidase est injectée dans les jours qui précèdent l'injection intradermique du colorant cette fois injecté

à l'état pur [41]. L'expérience, traduite par la figure 4, montre que cette préparation générale de l'organisme est efficace et qu'elle augmente la diffusion.

Pendant six jours, 10 rats reçoivent les injections intramusculaires suivantes :

1 ^{er} jour,	0,2 cm ³	de la dilution { Hyaluronidase ... 1,25 U. R. V.
2 ^e jour,	0,3 cm ³	de la dilution { NaCl à 7 p. 1000 5 cm ³
3 ^e jour,	0,3 cm ³	de la dilution
4 ^e jour,	0,3 cm ³	de la dilution
5 ^e jour,	0,3 cm ³	de la dilution
6 ^e jour,	0,3 cm ³	de la dilution

Le lendemain de la dernière injection, on injecte dans le derme le bleu trypan à l'état pur. La courbe représentative est compa-

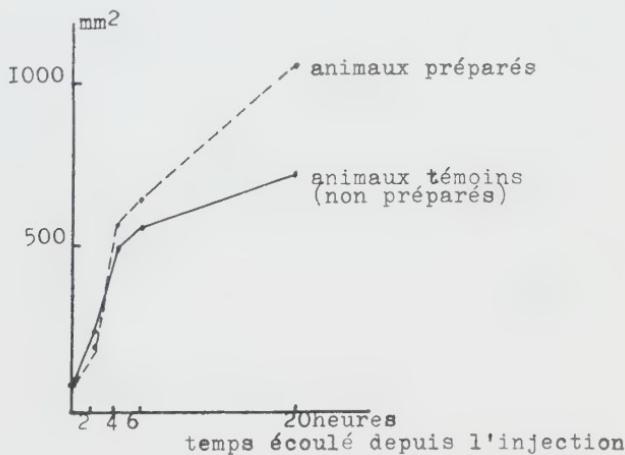


FIG. 4. — Effet d'un traitement antérieur par l'hyaluronidase sur la diffusion intradermique du bleu trypan.

rable à la courbe de la figure 3, relative à l'action du sérum anti-réticulaire.

VI. — INTERVENTION DE L'HYALURONIDASE SPÉCIFIQUE DANS L'ACTION DU SÉRUM ANTIRÉTICULAIRE.

Ces expériences viennent d'établir une identité remarquable entre les actions du sérum antiréticulaire d'une part et de l'hyaluronidase d'autre part. Or, il ne s'agit pas là de faits séparés : une expérience, suggérée par A. Lacassagne [42], va mettre en évidence la connexion étroite qui relie les actions de ces deux

agents et qui va même expliquer comment agit le sérum antiréticulaire.

Pour l'une et l'autre de ces deux substances, l'expérience a montré qu'il existe une dose-limite, au delà de laquelle l'effet favorisant fait place à une action inhibitrice. On peut se demander ce qui se passe quand on administre simultanément les deux substances.

1° L'expérience suivante, plusieurs fois répétée, donne des résultats constants. Des rats, de poids sensiblement égaux, reçoivent dans la peau du dos une injection intradermique conte-

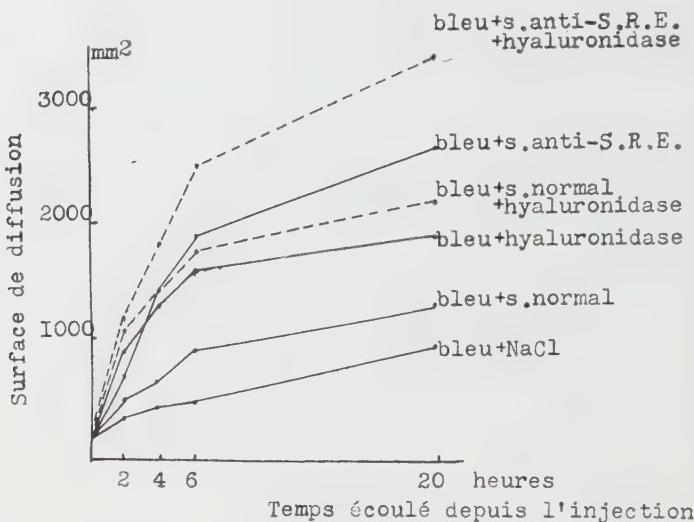


FIG. 5. — Diffusion du bleu trypan en présence du sérum antiréticulaire et de l'hyaluronidase, soit associée, soit agissant isolément.

nant une même quantité de solution de bleu trypan à 1 p. 100, associée : a) à un soluté pur de NaCl à 7 p. 1 000 dans le cas des témoins ; b) à du sérum de lapin normal ; c) à du sérum antiréticulaire ; d) à de l'hyaluronidase ; e) à un mélange d'hyaluronidase et de sérum normal ; f) à un mélange d'hyaluronidase et de sérum antiréticulaire. Les courbes, traduisant les surfaces des champs de diffusion du colorant après vingt-quatre heures, sont reproduites dans la figure 5. L'addition des effets des deux facteurs y est nettement mise en évidence.

Comment interpréter cette synergie d'une hyaluronidase et du sérum antiréticulaire ? Comme il a été rappelé précédemment, l'hyaluronidase augmente la diffusion en dépolymérisant l'acide

hyaluronique de la substance fondamentale du tissu conjonctif ; il en résulte une diminution de la viscosité, ce qui permet une diffusion plus rapide du colorant.

Puisque le sérum antiréticulaire exerce une action identique à celle de l'hyaluronidase, le phénomène peut être interprété de deux façons : *a)* ou bien ce sérum contient une hyaluronidase ; *b)* ou bien il provoque, au lieu même de l'injection, la libération d'un enzyme de type hyaluronidase, lequel ne peut provenir, dans cette expérience que des éléments du derme.

Quant à l'hypothèse d'une origine infectieuse, elle est à

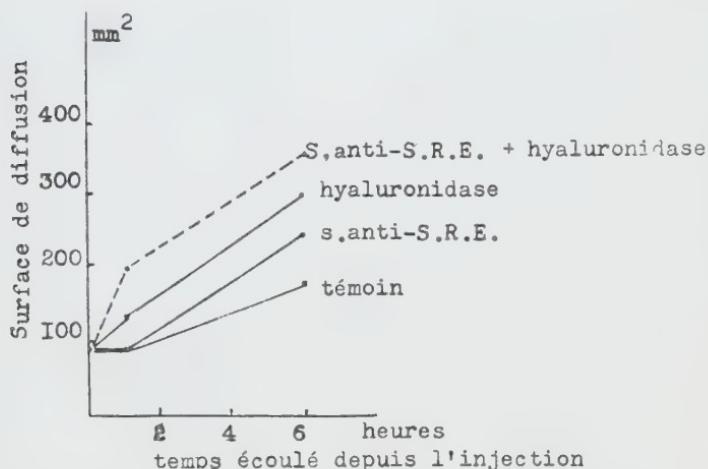


FIG. 6. — Diffusion *in vitro*, dans un lambeau de peau isolé. Le colorant est additionné soit de sérum antiréticulaire, soit d'hyaluronidase, soit de leur mélange.

éliminer, puisque du sérum prélevé dans les mêmes conditions à un lapin normal — non préparé — n'exerce pas d'effet comparable.

D'autre part, le sérum antiréticulaire ne contient pas d'hyaluronidase. Pour rechercher la présence possible de cette dernière, le sérum a été mélangé avec une solution d'acide hyaluronique à pH = 7,2. Qu'il s'agisse du sérum de lapin normal ou de sérum antiréticulaire, aucune variation de la viscosité n'a été observée après un séjour de deux heures à l'étuve à 37°. Inversement, dans la même expérience, réalisée avec l'hyaluronidase utilisée dans ces expériences, on a enregistré une chute considérable (88,6 p. 100) de la viscosité.

La seule interprétation de ces expériences consiste donc à altri-

buer au sérum la propriété de libérer une hyaluronidase à partir des éléments du derme.

2^o Voici encore une expérience qui renforce cette conclusion.

Au lieu d'opérer sur l'animal vivant, on peut tout aussi bien prélever la peau d'un rat endormi. L'injection des différents mélanges précédents est pratiquée immédiatement après le prélèvement. L'étendue de la diffusion est mesurée au cours des premières heures qui suivent les injections. L'expérience a d'autant plus de rigueur que les différentes injections sont effectuées sur



FIG. 7. — Diffusion, *in vitro*, du bleu trypan dans la même peau de rat : I. Bleu seul ; II. Bleu + sérum antiréticulaire ; III. Bleu + hyaluronidase ; IV. Bleu + sérum + hyaluronidase.

la même peau. Pendant toute la durée de l'expérience, la peau est conservée, étalée dans le liquide de Tyrode, à l'étuve à 37°. La diffusion est moins importante (dix fois moins environ) que sur l'animal vivant. Néanmoins, la courbe de la figure 6 montre que, dans ces conditions aussi, le mélange d'hyaluronidase et de sérum antiréticulaire entraîne une diffusion accrue.

Le résultat de l'expérience ressort d'ailleurs clairement de la simple inspection de la photographie de la peau (fig. 7), prise à la fin de l'expérience.

De ces deux expériences de diffusion *in vivo* et *in vitro*, il résulte que l'injection intradermique du sérum provoque *in situ*

la libération d'une hyaluronidase, à partir des éléments du derme. Cette substance, contrairement à l'enzyme d'origine bactérienne, est donc spécifique du rat.

Il est dès lors permis d'attribuer à un tel mécanisme l'action favorable exercée par le sérum sur la cicatrisation des plaies.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les phénomènes qui ont été considérés ici — la cicatrisation et la diffusion d'un colorant — intéressent, tous les deux, le derme.

Un premier fait, c'est que l'un et l'autre de ces phénomènes sont activés par le sérum antiréticulaire.

Un deuxième fait, c'est que les deux phénomènes précités sont activés également par une hyaluronidase d'origine bactérienne, et que cette activation est comparable à l'effet du sérum.

Enfin, la synergie manifestée par l'action simultanée du sérum et de l'hyaluronidase permet l'interprétation suivante pour le mode d'action du sérum : ce dernier provoque une libération d'hyaluronidase dans le tissu conjonctif : d'où diminution de la viscosité de celui-ci et activation de son métabolisme local, ce qui explique à la fois l'action du sérum sur la cicatrisation et sur la diffusion.

SUMMARY.

Cicatrization and diffusion of a dye are activated by anti-reticular serum.

Both phenomena are also activated in the same way by a bacterial hyaluronidase.

The simultaneous action of serum and hyaluronidase is synergistic. This allows the following interpretation for the mechanism of action of serum : the serum causes a release of hyaluronidase in the connective tissue ; the enzyme provokes a diminution of the tissue viscosity and an activation of its local metabolism. This explains the action of anti-reticular serum, both on the cicatrization and on the diffusion.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LINGBERG (B. E.). *Am. Rev. Sovet. Med.*, 1943, **1**, 124.
- [2] MALISOFF (W. M.) et GARDNER (T. S.). *J. Tenn. Acad. Sci.*, 1951, **26**, 89.
- [3] MALTZ (M.), SPAIN (P. M.) et MOLONUT (N.). *J. Immunol.*, 1948, **60**, 313.

- [4] STRAUSS (R.), HORNWITZ (M.), LEVINTHAL (D. H.), COHEN (A. L.) et RUNJAVAC (M.). *J. Immunol.*, 1946, **54**, 163.
- [5] SCHNEIDER (M.), GILIAN (H. D.), POMERAT (C. M.), ORMSBY (A.), EGGERS (G. W. N.) et AINSWORK (W. H.). *Texas Rep. biol. Med.*, 1950, **8**, 3.
- [6] LASFARGUES (E.) et DELAUNAY (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 909.
- [7] LOISELEUR (J.) et ZAJDELA (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 53.
- [8] LOISELEUR (J.) et VELLEY (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2155.
- [9] LOISELEUR (J.), CATINOT (M^{me} L.) et LEVAL (M^{me} M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1514.
- [10] DURAN-REYNALS (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **57**, 597.
- [11] LOISELEUR (J.), CATINOT (M^{me} L.) et LEVAL (M^{me} M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1649.
- [12] LACASSAGNE (A.) et LOISELEUR (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1797.

IMMUNISATION AVEC L'ANATOXINE *OEDEMATIENS*

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. DEVISME (*).

(Institut Pasteur)

Toutes les statistiques concordent à établir que *Cl. oedematiens*, *W. perfringens* et *Cl. septicum* sont très répandus dans la nature. La plupart des traités de bactériologie décrivent les phlegmons gazeux et les viscérites graves provoquées chez l'homme et les animaux par ces trois anaérobies toxinogènes. De nombreux auteurs ont contribué à mettre en lumière, d'une part, les propriétés des cultures faites avec ces anaérobies, d'autre part, l'efficacité des vaccins dérivés de chacune de ces cultures. Quelques expérimentateurs ont employé avec succès des vaccins complexes, capables d'immuniser à la fois contre les deux premiers anaérobies cités ou contre les trois.

Au cours de l'exposé qui suit, nous examinons surtout l'ubiquité de *Cl. oedematiens* type A et les résultats des recherches sur la vaccination anti-*oedematiens*.

Ubiquité et pouvoir pathogène de *Cl. oedematiens*.

Weinberg et Seguin en 1915 [1], puis Legros, Vaucher, Dalyell en 1917 [2], isolent *Cl. oedematiens* dans les plaies des soldats blessés en France sur les champs de bataille. D'après Weinberg et Seguin [1 c], *Cl. oedematiens* est présent dans 34 p. 100 et *W. perfringens* dans 77 p. 100 des blessures de guerre. Vaucher, Dalyell signalent la coexistence de *Cl. oedematiens* et *W. perfringens* dans des plaies.

En 1925, Zanolli et Catino étudient la flore anaérobie des abcès qui apparaissent chez des chevaux producteurs de sérums anti-venimeux en Argentine : dans les abcès gazeux produits au point de l'inoculation des venins, Zanolli et Catino trouvent *Cl. septicum* et d'autres agents de la gangrène humaine, notamment *Cl. oedematiens* ou *W. perfringens* [3].

Mejlbo, en 1925 [4], cite au Danemark un cas de gangrène gazeuse à *Cl. oedematiens* chez le porc. En 1927, Turner et Davesne [5] iden-

(*) Manuscrit reçu le 4 mai 1956.

tifient à *Cl. œdematiens* le bacille isolé en Australie par Albiston [6] dans les foyers nécrosés du foie des moutons morts de « Black Disease » (hépatite nécrosante infectieuse). En 1928, Turner [7] met bien en évidence le rôle de *Cl. œdematiens* dans l'hépatite nécrosante du mouton très fréquente en Australie. Zeissler isole plusieurs fois *Cl. œdematiens* chez des porcs, chevaux, bovins, moutons, morts de la gangrène gazeuse en Europe septentrionale, occidentale ou centrale, ainsi qu'en Australie et en Amérique du Sud. Zeissler et Rassfeld [8] trouvent *Cl. œdematiens* dans 64 p. 100 des 200 échantillons de terre examinés et *W. perfringens* dans tous les échantillons. Cette observation tend à expliquer la présence simultanée des bactéries *œdematiens* et *perfringens* dans beaucoup de plaies.

En 1929, Bosworth et Jordan [9] étudient en Grande-Bretagne une infection épидémique bovine due à *Cl. œdematiens*. Geiger [10] trouve *Cl. œdematiens* associé à d'autres germes dans 10 cas d'infections gazeuses observées chez les porcs.

En 1931, Carré, Rijnard et Debonera [11] signalent des cas mortels d'hépatite nécrosante chez des moutons, dans trois départements français : Loir-et-Cher, Seine-et-Oise, Pas-de-Calais. Ces auteurs, tout comme Albiston et Turner, insistent sur les faits suivants : la mort des animaux survient en quelques heures ; *Cl. œdematiens* pullule dans les parties nécrosées du foie.

En 1932, Pieming [12] trouve *Cl. œdematiens* dans des fragments desséchés d'intestins de provenances diverses. Graham ainsi que Turner isolent ce germe dans le foie des moutons sains vivant dans les contrées d'Australie où l'on enregistre de nombreux cas mortels d'hépatite nécrosante infectieuse. Graham en Australie et Scheuber [13] en Afrique du Sud considèrent *Cl. œdematiens* comme responsable des cas mortels de gangrène observés chez des moutons ayant reçu à la tête des coups de bec d'oiseaux carnassiers.

En 1935, Bull [14] attribue à *Cl. œdematiens* les cas de « swelled head » constatés chez les bétiers d'Australie. Cernianu et Mihailescu [15] signalent en Bessarabie des cas d'hépatite nécrosante chez le mouton.

En 1937, Jansen [16] trouve *Cl. œdematiens* dans un phlegmon accidentel, survenu à l'endroit où des porcs avaient reçu une inoculation de vaccin contre la peste porcine.

En 1939, Tunnicliff et Marsh [17] observent dans le Montana occidental de nombreux cas ovins d'hépatite nécrosante à *Cl. œdematiens*, Dumaresq [18] cite un cas équin d'hépatite nécrosante due à cet anaérobie.

Van Saceghem [19] au Congo Belge, Byrne et Armstrong [20] constatent des cas de charbon symptomatique à *Cl. œdematiens* chez le bétail.

Defilippo [21] isole *W. perfringens* et *Cl. œdematiens* dans un cas humain d'entérocolite gangrénouse mortelle. Mollaret, Prévot et Guéniot (1948) trouvent *Cl. œdematiens* dans les lésions nécrotiques du foie d'un paralytique général ayant présenté un ictère grave, mortel en vingt-quatre heures [22].

En 1950, Prévot, Urbain, Nouvel et Piette [23] constatent l'existence de *Cl. œdematiens* dans les foyers hémorragiques du cou de

différentes tortues géantes de Madagascar, mortes dans le Jardin Zoologique de Vincennes.

Récemment (1955), nous avons identifié à *Cl. oedematiens* le germe isolé par A. Vallée dans la sérosité présente à la face interne de la cuisse d'un cadavre de porc provenant d'une ferme du Loiret. La culture de ce germe, faite en bouillon Vf à 37°, contenait, vingt heures après l'ensemencement, 250 doses mortelles de toxine d'après nos titrages sur souris de 17 à 20 g (injections sous-cutanées) ; l'action létale de cette toxine a été supprimée par des doses spécifiques de sérum anti-*oedematiens* type A de l'Institut Pasteur. Dans le département de l'Eure, M. Devisme a prélevé des fragments d'intestin et de foie à un porc trouvé mort le matin alors qu'il paraissait en bonne santé la veille. L'étude bactériologique de la flore intestinale a mis en évidence une souche toxinogène de *Cl. oedematiens* ; la toxine que nous avons préparée avec cette souche a été neutralisée par le sérum anti-*oedematiens* A.

L'énumération de cette série de faits indique la gravité de la toxicoinfection due à *Cl. oedematiens*. Aussi n'est-il pas étonnant que des travaux aient été entrepris de toutes parts pour préparer des vaccins contre cet anaérobie.

Vaccination anti-*oedematiens*.

HISTORIQUE.

En 1917, Weinberg et Seguin [4 c] réussissent à immuniser le lapin, le mouton et le cheval en leur inoculant, sous la peau, d'abord des doses faibles de toxine *oedematiens* diluée (pour éviter des réactions locales trop importantes), puis de la toxine non diluée. L'immunisation des moutons et des chevaux est poursuivie pendant plusieurs mois. Un lapin ayant reçu cinq inoculations de toxine en un mois est saigné dix jours après la cinquième inoculation : 0,01 ml de sérum de cet animal neutralise une dose mortelle (DM) de toxine *oedematiens*.

Après les travaux de G. Ramon [24], mettant en évidence les avantages que l'on peut tirer en immunologie de l'emploi des toxines diphtériques et tétaniques formolées (anatoxines), Weinberg et Prévot [25] indiquent leurs observations sur la valeur antigénique des toxines gangréneuses formolées (1).

Turner [7] emploie successivement une toxine *oedematiens* formolée puis une culture *oedematiens* formolée (anaculture) pour vacciner des lapins, des cobayes et des moutons ; ces expérimentateurs montrent que les moutons présentent une immunité convenable après deux injections de 5 ml d'anaculture *oedematiens* effectuées à un mois d'intervalle. Cet auteur réussit dès lors en Australie à enrayer les enzooties à *Cl. oedematiens*.

(1) Weinberg et Prévot signalent notamment la production importante d'antitoxine chez les chevaux hyperimmunisés avec l'anatoxine *oedematiens* et les résultats de la vaccination des cobayes à l'aide de l'anatoxine *perfringens* ou de l'anatoxine *septicum* [25].

En Bessarabie, Cernianu et Mihailescu [45] immunisent efficacement de nombreux moutons en pratiquant une injection d'anaculture *œdematiens*.

Oxer [26] constate en 1937 que la réponse antitoxique des cobayes à l'anaculture *œdematiens* est plus forte quand la quantité totale d'anaculture administrée (5 cm^3) est injectée en deux fois, à trois semaines d'intervalle, que lorsqu'elle est injectée en une seule fois. Sachant qu'un toxoïde diptérique ou tétanique additionné d'alun de K détermine une plus grande production d'antitoxine que le toxoïde seul [27], Oxer recherche si l'alun accroît l'efficacité des vaccins anti-*œdematiens*; il démontre l'action favorable de ce sel : une injection de 2,5 ml d'anaculture *œdematiens* précipitée par une forte quantité d'alun de K (2 p. 100) provoque une immunité plus intense et plus durable chez les cobayes qu'une seule injection de 5 ml d'anaculture sans alun. Pour apprécier le degré d'immunité, l'auteur détermine le titre antitoxique du sérum prélevé aux cobayes à des dates variables à partir du huitième jour qui suit la vaccination [26]. Les expériences de D. T. Oxer [26] sur les moutons montrent que : a) quatorze jours après une seule inoculation d'anaculture *œdematiens* additionnée de 2 p. 100 d'alun, le sérum des moutons possède un pouvoir anti-*œdematiens* très marqué (le titre anti-*œdematiens* des sérums est recherché vis-à-vis de 8 DM (souris) de toxine *œdematiens*; b) le titre antitoxique des sérums récoltés vingt et un jours après la vaccination unique est supérieur à celui des sérums prélevés le quatorzième jour, puis l'immunité baisse graduellement pendant les semaines suivantes; c) trois mois après la vaccination, les moutons résistent à l'injection d'une suspension de spores de *Cl. œdematiens* additionnée de Cl_2Ca , puis à l'injection d'une DM (mouton) de culture *œdematiens*.

En 1939, Tunnicliff et Marsh [47] utilisent généralement de l'anatoxine *œdematiens* additionnée d'alun pour vacciner des cobayes et des brebis : les cobayes reçoivent deux inoculations sous-cutanées de 0,5 ml d'anatoxine à cinq ou huit jours d'intervalle et les brebis une seule injection de 5 ml. L'immunité des cobayes est contrôlée trois à quatre semaines après la vaccination : ces animaux résistent à l'injection sous-cutanée d'une quantité importante de toxine *œdematiens*. Les brebis qui sont éprouvées dix-sept mois après l'unique vaccination survivent à l'injection intraveineuse de 34 DM de toxine *œdematiens* (par 0,5 kg de poids corporel). Après avoir ainsi mis en évidence que l'immunité consécutive à une seule vaccination persiste à un niveau élevé pendant dix-sept mois, Tunnicliff [28] fait une injection intraveineuse de toxine *œdematiens* à 10 brebis vaccinées depuis trente-quatre mois ; 2 succombent à l'injection de 41 DM de toxine par 0,5 kg, mais 3 sur 6 survivent à l'injection de 24 DM de toxine ; les deux dernières supportent 12 DM. L'auteur suppose alors que le taux d'antitoxine *œdematiens* baisse entre les dix-septième et trentaquatrième mois qui suivent la vaccination ; mais, après avoir constaté que 8 brebis vaccinées depuis quarante-cinq mois résistent à l'injection de 12 DM de toxine et qu'une brebis vaccinée depuis cinquante-six mois survit à la même épreuve, Tunnicliff conclut qu'une vaccination unique en Australie confère au mouton une immunité extrêmement durable.

Robertson et Keppie [29] vaccinent les cobayes avec une anatoxine *œdematiens* concentrée, partiellement purifiée ; l'activité de ce toxoïde est exprimée en unités Lf ; les cobayes sont soumis à deux ou trois injections ; ils reçoivent en tout 20 à 30 unités Lf. L'intervalle entre les deux premières inoculations varie entre dix jours et trois semaines ; le délai entre la deuxième et la troisième est de onze à quatorze semaines. L'immunité est contrôlée huit semaines ou cinq mois après la deuxième injection ou six semaines après la troisième ; dans ce but, les auteurs injectent dans les muscles des cobayes une suspension de spores de *Cl. œdematiens* additionnée de Cl₂Ca : les cobayes supportent cent à cinq mille fois la dose qui est capable de tuer les témoins non vaccinés.

Après avoir rappelé que Komkova a réussi, en 1941, à immuniser d'abord des cobayes et des lapins, puis des hommes, en leur faisant des injections d'anatoxine *œdematiens*, Zelevinskaya et Ebert [30] relatent leurs propres observations : a) quarante-cinq jours après une seule injection de 1 ml d'anatoxine *œdematiens*, le sérum des cobayes titre 0,2 à 0,5 unité d'antitoxine *œdematiens* : ces cobayes résistent alors à une dose mortelle de culture *œdematiens*. Trois lots de cobayes reçoivent deux ou trois vaccinations, espacées de vingt jours (premier lot), de dix jours (deuxième lot) ou de cinq jours (troisième lot) : la dose injectée est de 0,5 ml la première fois, de 1 ml les autres fois ; l'immunité de différents cobayes est contrôlée quinze jours après la vaccination ; d'autres cobayes sont éprouvés vingt à trente-six jours après la vaccination. Le contrôle consiste à écraser le muscle de la cuisse des cobayes, puis à inoculer dans ce muscle une suspension de *Cl. œdematiens* et du Cl₂Ca. Résultat : 18 cobayes sur 19 résistent à l'injection, alors que les témoins meurent en vingt-quatre ou quarante-huit heures. b) Le sérum prélevé à des lapins ayant reçu deux injections d'anatoxine *œdematiens* (respectivement 1 et 2 ml), contient après la vaccination 0,5 à 2 unités d'antitoxine *œdematiens* ; après trois injections (1, 2 et 2 ml), le titre du sérum des lapins atteint 5 à 10 unités anti-*œdematiens*. Le délai entre les vaccinations successives est de vingt jours. Le sérum prélevé aux lapins quatre mois plus tard titre 0,1 à 0,5 unité : de tels lapins résistent à 25 DM de culture. c) L'immunisation des humains donne des résultats positifs : trois injections (1, 2 et 2 ml) espacées de vingt jours font apparaître 0,2 unité dans le sérum de deux personnes. Après quatre inoculations, le sérum d'un homme titre une unité anti-*œdematiens* onze jours après la dernière inoculation.

Adams [31] recherche en 1947 l'efficacité d'un *vaccin bivalent* (anatoxine *perfringens* + anatoxine *œdematiens*) additionné d'alun de K ; ce vaccin est injecté : 1^o par voie intrapéritonéale à des souris (l'immunité anti-*perfringens* de ces animaux est contrôlée par injection intrapéritonéale de toxine *perfringens*) ; 2^o par voie sous-cutanée à 7 cobayes et à 30 hommes ; les cobayes reçoivent une seule injection de 1 ml et les hommes deux injections de 1 ml espacées de trois semaines. Le sérum prélevé dans le cœur des cobayes, trois à quatre semaines après l'unique inoculation, titre 0,1 à 3 unités anti-*œdematiens*. Le sérum des hommes, trois semaines après la première injection, ne contient pas d'antitoxine *œdematiens* ; mais trois semaines après la

deuxième vaccination, le sérum de 22 hommes sur 30 (soit 75 p. 100) contient 0,2 à 1 unité d'antitoxine *œdematiens*; une nouvelle inoculation de 1 ml de vaccin analogue, faite cinq à six semaines plus tard, porte à 90 p. 100 le nombre d'individus ayant de l'antitoxine *œdematiens* décelable dans leur sérum. Le titre anti-*œdematiens* est déterminé d'après le procédé de J. Bengtson [32].

Berheimer [33] injecte à des hommes, à trois semaines d'intervalle, 1 ml d'un vaccin trivalent additionné d'alun de K. Ce vaccin est un mélange d'anatoxines *œdematiens*, *perfringens* et *septicum*. Du sang est prélevé aux hommes trois semaines après la deuxième vaccination. Le titrage des sérums indique que le vaccin mixte a déclenché la production des antitoxines anti-*œdematiens*, anti-*perfringens* et anti-*septicum*. Le titre anti-*œdematiens* est inférieur à 0,03 unité (4 hommes) ou compris entre 0,03 et 0,2 unité (15 hommes). Une troisième injection est faite cinq mois après la deuxième; trois semaines plus tard, le titre anti-*œdematiens* de 11 sérums humains est compris entre 0,15 et 0,6 unité; celui de 4 sérums atteint 1 unité: le titrage de l'antitoxine *œdematiens* est fait selon la méthode de J. Bengtson [32].

OBSERVATIONS PERSONNELLES.

Nous avons indiqué en 1942-1944 nos procédés de préparation de la toxine *œdematiens* [34 a, c]; nous avons signalé aussi le titre antitoxique élevé du sérum que fournissent les chevaux hyperimmunisés par de fortes doses de toxine *œdematiens* formolée (2). Ultérieurement, les circonstances nous ont donné l'occasion d'évaluer le pouvoir antitoxique de nombreux sérums prélevés à des chevaux, à des mulets ou à des bovins ayant seulement reçu une, deux ou quatre inoculations d'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens*, ou un mélange d'anatoxines *œdematiens*, *perfringens* et *septicum*. Les inoculations et les saignées ont été faites par nos collègues O. Girard, R. Corvazier et M. Cheyroux. Nous leur sommes extrêmement redevables de cet important concours. Les doses d'antigènes successivement injectées aux animaux soumis à 4 vaccinations, les délais entre les inoculations seront donnés en détail prochainement ainsi que le titre anti-*perfringens* du sérum prélevé à chaque animal après la quatrième inoculation. Notre but actuel

(2) D'après nos observations, la plupart des chevaux qui sont soumis tous les mois à des inoculations d'anatoxine *œdematiens* et à deux saignées de 6 l procurent du sérum contenant plus de 800 unités internationales (UI) d'antitoxine *œdematiens* par centimètre cube [34 b]; le sérum des chevaux hyperimmunisés titre 2 000 à 6 000 UI par millilitre [35]. Rappelons qu'une unité internationale d'antitoxine *œdematiens* neutralise généralement, d'après nos titrages par voie sous-cutanée à des souris de 17 à 20 g, 1 000 à 2 400 DM des toxines *œdematiens* que nous préparons [34 a et b, 36].

est de signaler brièvement le mode de préparation de l'anatoxine *œdematiens*, le procédé de détermination du pouvoir anti-*œdematiens* des sérum, le degré d'immunité anti-*œdematiens* observé chez le porc après deux injections sous-cutanées d'anatoxine *œdematiens* et de confronter l'effet de cette vaccination monovalente au résultat homologue que l'on obtient en inoculant aux équins et aux bovins de l'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens*.

PRÉPARATION DE L'ANATOXINE *œdematiens*. — Du bouillon Vf alcalin, additionné de 1,5 p. 1 000 de sang desséché [34 a], est stérilisé à l'autoclave, ensuite ensemencé avec une culture jeune de *Cl. œdematiens* puis maintenu à 37° pendant cinq jours ; la toxine alors obtenue est titrée par le procédé des injections sous-cutanées à des souris blanches de 17 à 20 g. La culture totale est formolée à 4 p. 1 000, laissée à 37° jusqu'à complète détoxicification puis conservée au frais, à l'abri de la lumière ; les microbes tués par le formol se déposent ; le liquide surnageant (anatoxine) est siphonné et utilisé après les contrôles bactériologiques et biologiques d'usage (stérilité, innocuité).

Nous avons recherché le titre anti-*œdematiens* du sérum des chevaux ayant reçu quatre injections intramusculaires d'anatoxine *œdematiens* préparée depuis des temps variables (doses injectées à trois ou quatre jours d'intervalle : 5, 10, 20, 30 ml) ; les résultats de ces recherches indiquent que l'anatoxine *œdematiens*, faite à partir de toxines contenant 3 000 à 6 000 DM par millilitre, possède encore une bonne valeur antigénique après conservation à la température de 4° ou 18° pendant un à dix ans.

TITRAGE DES SÉRUMS. — Pour déterminer le pouvoir anti-*œdematiens* d'un sérum quelconque, nous utilisons de la toxine *œdematiens* précipitée par le sulfate neutre d'ammonium, desséchée et titrée sur souris (injections sous-cutanées). Un volume précis du sérum à titrer est additionné d'une quantité connue de toxine *œdematiens* en solution dans l'eau physiologique ; le mélange sérum + toxine est laissé pendant quarante-cinq minutes à 37° puis injecté par voie sous-cutanée à des souris blanches de 17 à 20 g. Les animaux sont observés pendant trois jours.

RÉSULTATS DE LA VACCINATION. — *I. Porcs.* — Un premier essai porte sur 7 femelles. L'anatoxine *œdematiens* destinée à la vaccination de ces animaux a été faite à partir d'une toxine *œdematiens* contenant 3 000 DM par millilitre. Avant d'injecter cette anatoxine, du sang a été prélevé aux 7 truies ; les titrages ont montré que les sujets choisis ne manifestaient pas d'immunité anti-*œdematiens* appréciable. En effet, à la dose de 0,4 ml,

chacun des 7 sérums était inapte à supprimer l'action létale de 2 DM de toxine *œdematiens* (3).

Après le prélèvement du sang, les truies reçoivent, sous la peau, une première inoculation de 5 ml d'anatoxine *œdematiens* et dix-huit jours plus tard une deuxième inoculation de 5 ml de la même anatoxine. Du sang est prélevé à chaque animal onze jours après la deuxième vaccination. Les 7 sérums sont filtrés séparément après centrifugation prolongée.

Précisons qu'une unité internationale anti-*œdematiens* neutralise 1 380 DM de la toxine *œdematiens* employée au cours du titrage de ces sérums. Voici, en unités internationales (UI) par millilitre de sérum, les résultats des différents titrages :

Un sérum titre	0,5	UI anti- <i>œdematiens</i> .
Trois sérums titrent	0,5 à 1	UI anti- <i>œdematiens</i> .
Un sérum titre	1 à 2	UI anti- <i>œdematiens</i> .
Un sérum titre	2	UI anti- <i>œdematiens</i> .
Un sérum titre	2 à 5	UI anti- <i>œdematiens</i> .

Il est bien connu que la production des anticorps chez les animaux normaux est lente après la première injection d'un antigène alors qu'elle est rapide après la deuxième injection du même antigène. D'après les résultats ci-dessus, le sérum des sept porcs traités contient une quantité satisfaisante d'antitoxine *œdematiens* le onzième jour après la deuxième vaccination. Faisons toutefois remarquer que des prélèvements de sang n'ayant pas été faits tous les deux ou trois jours pour suivre le progrès de l'immunisation après la deuxième inoculation, les titres que nous citons ne correspondent peut-être pas au niveau maximum d'immunité atteint par les animaux vaccinés (4).

II. *Chevaux, bovins et mulets*. — A. Six chevaux et deux bovins reçoivent à quatre semaines d'intervalle une injection sous-cutanée de 20 ml d'un mélange à parties égales d'anatoxine *œdematiens* et d'anatoxine *perfringens*, c'est-à-dire 10 ml d'anatoxine *œdematiens* et 10 ml d'anatoxine *perfringens* à chaque injection. L'anatoxine *œdematiens* employée au cours de cet essai

(3) Le sérum des animaux normaux possède rarement un pouvoir anti-*œdematiens*. Nous avons signalé, en 1944, que 22 sérums équins normaux sur 25 étaient incapables, à la dose de 0,5 ml, de neutraliser 2 DM de toxine *œdematiens* [37]. Depuis cette date, nous avons fait agir 41 autres sérums normaux (38 équins et 3 bovins) sur la toxine *œdematiens*; aucun d'eux n'a pu, à la dose de 0,5 ml, supprimer la nocivité de 2 DM de toxine *œdematiens*.

(4) D'après les observations de D. T. Oxer [26], l'immunité des moutons atteint sa valeur maxima une semaine après la deuxième vaccination ou peut-être plus tôt, les volumes d'anaculture *œdematiens* injectés à un mois d'intervalle aux animaux étant respectivement de 2 et 8 ml.

a été obtenue en formolant une toxine qui titrait 6 000 DM par millilitre.

Du sérum est prélevé à trois reprises aux 8 animaux : avant la première injection, vingt-huit jours après celle-ci et quatorze jours après la deuxième inoculation. Chaque sérum est examiné au double point de vue de son activité anti-*œdematiens* et anti-*perfringens*. Les titrages en présence de toxine *œdematiens* fournissent les résultats suivants :

1° Avant la première vaccination, le sérum des 8 animaux ne manifeste pas d'activité anti-*œdematiens* : 0,5 ml de sérum ne neutralise pas 2 DM de toxine *œdematiens*.

2° Quatre semaines après la première vaccination, un sérum équin ne contient pas d'antitoxine anti-*œdematiens* ; les 7 autres sérums possèdent un très léger pouvoir antitoxique : un sérum équin, à la dose de 0,5 ml, neutralise 2 DM de toxine *œdematiens* ; 4 sérums (2 équins, 2 bovins), à la dose de 0,2 ml, neutralisent 2 DM de toxine ; 2 sérums équins, à la dose de 0,1 ml, neutralisent 5 à 10 DM de toxine.

3° Quatorze jours après la deuxième vaccination, le titre anti-*œdematiens* des sérums équins atteint les valeurs suivantes : 1 à 2 UI (1 sérum) ; 2 UI (2 sérums) ; 5 UI (2 sérums) ; 25 à 50 UI (1 sérum). Les deux sérums bovins titrent respectivement 2 à 5 UI et 5 à 10 UI. Donc 7 sérums sur 8 titrent 2 UI par millilitre ou davantage, quatorze jours après la deuxième injection sous-cutanée d'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens*.

B. Six chevaux et un bovin sont vaccinés par voie intramusculaire en même temps et dans les mêmes conditions que les animaux mentionnés en A : même antigène bivalent, mêmes doses, même délai entre les inoculations et les prélèvements du sang.

RÉSULTATS. — 1° Avant la vaccination, le sérum des 7 animaux n'a pas d'activité anti-*œdematiens* ; 2° quatre semaines après la première inoculation, le sérum de chaque animal est nettement antitoxique : le sérum qui présente le titre plus faible peut, à la dose de 0,2 ml, neutraliser 2 DM de toxine *œdematiens* ; le sérum le plus riche en antitoxine *œdematiens* neutralise 25 à 100 DM de toxine, à la dose de 0,1 ml ; 3° quatorze jours après la deuxième vaccination, tous les sérums contiennent plus de 2 UI par millilitre ; les titres des sérums équins sont en effet les suivants : 2 à 5 UI (1 sérum) ; 5 UI (2 sérums) ; 5 à 10 UI (2 sérums) ; 10 UI (1 sérum) ; le sérum bovin titre 25 à 50 UI.

C. Un des procédés employés par MM. Lemétayer, Nicol, Girard, Corvazier et Cheyroux pour stimuler la formation de différents anticorps (anti-diphthériques, anti-tétaniques ou anti-

botuliques) a été appliqué à la vaccination anti-gangréneuse pendant plusieurs années.

Cent un chevaux ou mulets (répartis en dix groupes) ont reçu, en dix jours, quatre inoculations de doses croissantes d'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens* et de 0,4 p. 100 d'alun de potassium : il a été injecté en tout, à chacun de ces animaux, 65 ml d'anatoxine *œdematiens* et 65 ml d'anatoxine *perfringens* (5). Une saignée d'épreuve a été faite à chaque sujet après la vaccination ; suivant le groupe auquel appartenait ce sujet, le sang a été prélevé le cinquième, le septième, le huitième ou le dixième jour après la quatrième inoculation, par conséquent quinze à vingt jours après la première inoculation ; chaque sérum a été titré, d'une part, en présence de toxine *œdematiens*, d'autre part, vis-à-vis de la toxine *perfringens*. Le titre des sérums prélevés le même jour à tout groupe d'animaux vaccinés *exactement* dans les mêmes conditions a montré, ainsi qu'il fallait s'y attendre, que les équidés en expérience n'avaient pas réagi avec la même intensité à la même quantité d'antigène.

Le résultat global de nos titrages en présence de toxine *œdematiens* indique ceci : 7 sérums à la dose de 0,4 ml ne neutralisent pas 2 DM de toxine (2 de ces sérums ont été récoltés cinq jours après la quatrième inoculation, les 5 autres le septième jour après cette inoculation). Les 94 sérums restants, prélevés cinq à dix jours après la dernière vaccination, exercent une activité anti-*œdematiens* appréciable : en effet, 4 sérums à la dose de 0,4 ml neutralisent 2 DM de toxine ; 10 sérums titrent 0,5 à 1 UI ; les autres titres anti-*œdematiens* observés s'échelonnent entre 1 et 2,5 UI (16 sérums) ; 2,5 et 10 UI (39 sérums) ; entre 10 et 25 UI (20 sérums) ; entre 25 et 50 (4 sérums) ; entre 40 et 60 (1 sérum). Le titre de ces 80 derniers sérums atteste que l'antigène injecté détermine très souvent chez les équidés une élaboration rapide et importante d'antitoxine *œdematiens*.

Nos titrages en présence de toxine *perfringens* révèlent qu'il existe de l'antitoxine *perfringens* *a* dans le sérum des équidés et bovidés auxquels on a fait deux ou quatre inoculations d'anatoxines *œdematiens* et *perfringens* dans les conditions que nous avons mentionnées dans les paragraphes A, B et C. Nous avons titré 115 sérums : un sérum par animal vacciné. Quatorze sérums ont été prélevés quatorze jours après deux inoculations espacées d'un mois : le moins antitoxique

(5) L'antigène *œdematiens* a été obtenu en formulant des foxines *œdematiens* faites à des dates différentes ; ces toxines contenaient généralement 3 000 à 4 000 DM par ml, parfois 6 000 avant l'addition du formol. Nous avons préparé l'anatoxine *perfringens* en ajoutant 4 p. 1 000 de formol à des toxines *perfringens* dont le titre, déterminé sur souris par voie veineuse, était le plus souvent de 20 à 30 DM par ml et quelquefois atteignait 40 DM par ml.

titrait alors 0,5 à 1 UI anti-*perfringens a*, et le plus antitoxique, 50 UI ; 101 sérums ont été récoltés cinq à dix jours après quatre inoculations faites en dix jours : le titre de 99 de ces sérums s'échelonnait entre 0,5 et 150 UI anti-*perfringens a* ; nous mentionnons plus loin le titre anti-*a* très élevé des deux autres sérums fourni par deux chevaux doués d'une aptitude réactionnelle exceptionnelle. En groupant les résultats des 115 titrages, on voit que : le titre anti-*perfringens a* de 31,3 p. 100 des sérums est compris entre 0,5 et 10 UI ; celui de 51,3 p. 100 des sérums est compris entre 10 et 60 UI ; 15,6 p. 100 des sérums titrent entre 60 et 150 UI. Un sérum titre 200 à 250 anti-*a* et un autre 250 UI, respectivement cinq et huit jours après quatre inoculations d'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens* et d'alun de K.

Résumé.

Onze jours après deux injections de 5 ml d'anatoxine *œdematiens*, faites à dix-huit jours d'intervalle à des pores, le sérum des animaux contient une quantité importante d'antitoxine *œdematiens*.

Le titre anti-*œdematiens* du sérum prélevé à des chevaux ou à des bovins, quatorze jours après la deuxième inoculation d'anatoxine *œdematiens* additionnée d'anatoxine *perfringens*, est égal ou supérieur à 2 unités internationales dans 14 cas sur 15 ; dans deux de ces cas, le titre des sérums dépasse même 25 UI ; temps écoulé entre les deux vaccinations : quatre semaines ; volume d'anatoxine *œdematiens* injecté chaque fois : 10 ml.

Le sérum de 64 p. 100 des chevaux ou des mulets qui ont reçu quatre inoculations de doses croissantes d'anatoxines *œdematiens* et *perfringens* contient plus de 2,5 UI d'antitoxine *œdematiens* par millilitre, cinq à dix jours après la dernière inoculation faite dix jours après la première.

SUMMARY.

Horses and mules receive within 10 days, four injections of *œdematiens* toxoid + *perfringens* toxoid. Five to ten days after the last injection, they are bled. The serum of each animal is titrated in presence of *œdematiens* toxin precipitated by neutral ammonium sulfate. Seven sera out of 101 do not possess *œdematiens* antitoxin ; 4 possess traces, 10 have a titre of 0,5-1 anti-*œdematiens* IU/ml ; 80 contain 1 to 60 IU/ml.

Swine serum has a titre of 0,5-5 anti-*œdematiens* IU 11 days after 2 injections of 5 ml *œdematiens* toxoid made at 18 days interval.

Horses and bovine sera generally possess more than 2 anti-*œdematiens* IU, 14 days after 2 inoculations of a mixture of *œdematiens* and *perfringens* toxoid ; these two inoculations are

given at 4 weeks interval; the volume of *œdematiens* toxoid injected each time is 10 ml.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WEINBERG (M.) et SEGUIN (P.). a) *C. R. Soc. Biol.*, 1915, **78**, 507 et 552 ; b) *C. R. Acad. Sci.*, 1917, **164**, 365 ; c) *La gangrène gazeuse*. Masson, édit., Paris, 1917.
- [2] LEGROS (G. V.). *Presse médicale*, 1917, 101. — VAUCHER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1917, **80**, 251. — DALYELL (E. J.). *Brit. med. J.*, 1917, 361 ; *Med. Res. Committee*, vol. LIX.
- [3] ZANOLLI (C.) et CATINO (N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 817.
- [4] MEJLBO (E.). *Centralbl. Bakt. I. Or.*, 1925, **95**, 339.
- [5] TURNER (A. W.) et DAVESNE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, **61**, 1078 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 921.
- [6] ALBISTON (H. E.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1927, **4**, 113.
- [7] TURNER (A. W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 558. *Austr. vet. J.*, 1929, **5**, 11.
- [8] ZEISSLER (J.) et RASSFELD (L.). *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, 1928, **4**, 1117 ; *Arch. wiss. prakt. Tierheilk.*, 1929, **59**, 419 ; *Die anaerobe Spörenflora der europäischer Kriegsschauplätze*, 1917, Fischer, édit. Iéna, 1928.
- [9] BOSWORTH (T. J.) et JORDAN (L.). *Vet. J.*, 1929, **85**, 393.
- [10] GEIGER (W.). *Dtsche tier. Wsch.*, 1929, 561.
- [11] CARRÉ (H.), RINJARD (P.) et DEBONERA (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 387.
- [12] PIENING (C.). *Zentralbl. Bakt. I. Or.*, 1932, **124**, 216.
- [13] SCHEUBER (J. R.). *18th Report of the Director of Vet. Serv.*, Onderstepoort, août 1932, 141.
- [14] BULL (L. B.). *J. comp. Path.*, 1935, **38**, 21.
- [15] CERNIANU (C.) et MIHAILESCU (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1585.
- [16] JANSEN (J.). *Tijdschr. Diergeneesk.*, 1932, **59**, 117, 1937, **64**, 26.
- [17] TUNNICLIFF (E. A.) et MARSH (H.). *J. am. vet. med. Assoc.*, 1939, **94**, 98.
- [18] DUMARESQ (J. A.). *Austral. vet. J.*, 1939, **15**, 53.
- [19] VAN SACEGHEM. *Rev. Path. comp.*, 1947, 218.
- [20] BYRNE (J. L.) et ARMSTRONG (J. H. O.). *Canad. J. comp. Med.*, 1948, **12**, 155 ; *Encyclop. vét. pér.*, Lyon, 1950, **7**, 128.
- [21] DEFILIPPO (R. A.). *Arch. Soc. Argent. Anat.*, 1948, **10**, 123.
- [22] MOLLARET (P.), PRÉVOT (A.-R.) et GUÉNIOT (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 195.
- [23] PRÉVOT (A.-R.), URBAIN (A.-Ch.), NOUVEL (J.) et PIETTE (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 203.
- [24] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **177**, 1338 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 1.
- [25] WEINBERG (M.) et PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 227.
- [26] OXER (D. T.). *Austral. vet. J. Sci.*, 1937, 13.
- [27] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 38. — GLENNY (A. T.). *Brit. med. J.*, 1930, **2**, 244.

- [28] TUNNICLIFF (E. A.). *J. am. vet. Med. Assoc.*, 1940, **96**, 106 ; 1943, **103**, 368.
- [29] ROBERTSON (M.) et KEPPIE (J.). *Lancet*, 1943, **2**, 311.
- [30] ZELEVINSKAYA (S. A.) et EBERT (M. K.). *J. Microb. Epid. Immunol.*, 1944, **9**, 16.
- [31] ADAMS (Mark H.). *J. Immunol.*, 1947, **56**, 323.
- [32] BENGTSON (L.). *Publ. Hlth Rep.*, 1936, **51**, 266.
- [33] BERHEIMER (Alan W.). *J. Immunol.*, 1947, **56**, 317.
- [34] GUILLAUMIE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, a) 1942, **68**, 202 ; b) 1943, **69**, 146 ; c) 1944, **70**, 86.
- [35] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.), FABRE (M.) et BÉCOULET (G.). *Rev. Immunol.*, 1952, **16**, 257.
- [36] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.), GEOFFROY (M.) et READE (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 418.
- [37] GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 68.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE DE *MALLEOMYCES PSEUDO-MALLEI*

II. DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE DES ANTIGÈNES *M*, *K* ET *O* ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES

par L. CHAMBON et J. FOURNIER.

(*Institut Pasteur de Saigon*)

Nous avons vu précédemment que les caractères des différentes phases de *Malleomyces pseudo-mallei* paraissaient déterminés par diverses associations de quatre facteurs antigéniques : l'antigène muqueux *M*, l'antigène d'enveloppe *K*, l'antigène somatique *O* et l'antigène *R*.

En l'absence de formes *S* ou *R* entièrement dépourvues d'antigène *M* ou *K*, nous avons préparé des sérum agglutinants spécifiques en mettant à profit l'action différente de certains agents physico-chimiques sur chacun de ces antigènes.

A. — TECHNIQUES.

a) PRÉPARATION DES SUSPENSIONS MICROBIENNES. — Des tubes de gélose nutritive inclinée glucosée à 0,1 p. 100 sontensemencés avec une culture en bouillon glucosé à 1 p. 100 de la souche de bactérie de Whitmore C 141, lisse et virulente. Après dix-huit heures d'étauve à 37°, on récolte la culture, caractérisée par de nombreuses colonies opaques, en bouillon nutritif. Des boîtes de Roux, contenant chacune 250 ml de gélose nutritive, sontensemencées avec cette suspension à raison de 2 ml par boîte. La récolte est effectuée en eau physiologique après dix-huit heures d'incubation à 37°.

Suspension formolée. — Une suspension en eau physiologique contenant $2 \cdot 10^9$ germes, lavés trois fois, par millilitre est soumise à l'action du formol à la concentration de 0,5 p. 100 pendant vingt heures à 37°.

Suspensions chauffées à 60°, 100°, 120°. — Trois suspensions en eau physiologique contenant $20 \cdot 10^9$ germes, lavés une fois, par millilitre sont respectivement soumises à un chauffage à 60° pendant une heure, à 100° pendant deux heures et demie et à 120° pendant deux heures. Elles sont ensuite lavées deux fois puis formolées à 0,5 p. 100.

(*) Manuscrit reçu le 16 avril 1956.

Suspensions traitées par l'alcool éthylique à 50 et 96 p. 100. — Deux suspensions, l'une dans de l'alcool éthylique à 50 p. 100, l'autre dans de l'alcool éthylique à 96 p. 100, contenant chacune $20 \cdot 10^9$ germes, lavés une fois, par millilitre, sont incubées pendant vingt heures à 37°. Elles sont ensuite lavées deux fois puis formolées à 0,5 p. 100.

Suspension traitée par l'acide chlorhydrique normal. — Des germes lavés une fois sont mis en suspension dans de l'eau distillée de façon à avoir $40 \cdot 10^9$ g/ml. On ajoute une quantité d'acide chlorhydrique 2 N égale à celle d'eau distillée. On obtient ainsi une suspension de $20 \cdot 10^9$ germes par millilitre d'acide chlorhydrique N. Cette suspension est mise dans un ballon contenant des billes de verre que l'on laisse à l'étuve à 37° pendant vingt heures et que l'on agite de temps en temps. Les germes sont ensuite soumis à deux lavages soigneux avec dissolution complète des agglomérats, puis formolés à 0,5 p. 100.

Pour la préparation de tous ces antigènes, les lavages sont effectués en eau physiologique. Les suspensions finales en eau physiologique, contenant $20 \cdot 10^9$ g/ml et formolées à 0,5 p. 100, sont soumises à une décantation de vingt-quatre heures à + 4° qui permet d'éliminer un culot formé d'agglomérats indissociables. Elles sont ensuite conservées à + 4°. La suspension traitée par N-HCl est instable à 37°.

b) EXTRACTION CHIMIQUE DE L'ANTIGÈNE O. — Il s'agit d'un extrait trichloracétique préparé suivant la technique de Boivin et Mesrobeanu [1].

c) PRÉPARATION DE SÉRUMS AGGLUTINANTS. — 1° *A partir des suspensions microbiennes.* — Les suspensions dont nous venons d'indiquer la préparation sont diluées en eau physiologique de façon à obtenir une densité égale à $500 \cdot 10^6$ germes par millilitre.

Chacune d'elles est injectée par voie veineuse à un lapin aux doses de 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5 ml, à raison d'une injection tous les cinq jours.

2° *A partir de l'extrait trichloracétique.* — On injecte par voie veineuse au lapin 10 ml d'une solution de concentration non déterminée d'extrait trichloracétique en cinq injections faites à quatre jours d'intervalle.

Les lapins sont saignés une semaine après la dernière injection.

Les sérumains ainsi préparés sont additionnés de 0,01 p. 100 de merthiolate et conservés à 4°.

d) RÉACTIONS D'AGGLUTINATION ET D'ABSORPTION DES AGGLUTININES. — Les réactions d'agglutination sont faites par centrifugation et sur lame. Dans le premier cas, X gouttes de suspension microbienne sont mélangées à X gouttes de dilution des sérumains et la lecture est effectuée après cinq minutes de centrifugation à 2 000 t/m. Dans le second, les mélanges contiennent I goutte de suspension microbienne et I goutte de dilution des sérumains et la lecture est faite après une agitation de quatre à vingt minutes sur un agitateur de Kline.

Les résultats sont notés de la façon suivante :

Centrifugation.
 + + + : agglutinats dans un liquide clair.
 + + : agglutinats dans un liquide trouble.
 + : agglutinats visibles à l'œil nu.
 ± : agglutinats visibles à la loupe.

Sur lame. Le nombre de signes + (de +++ à ±) est fonction de l'intensité de la réaction.

L'absorption des agglutinines est faite suivant deux techniques : saturation des sérum par des suspensions microbiennes très denses au cours d'un séjour de deux heures à 37° et de dix-huit heures à 4° ; technique quantitative de Felix et Pitt [2].

★★

Dans la suite de notre exposé, nous désignerons les suspensions microbiennes traitées par le formol à 0,5 p. 100, l'alcool à 50 p. 100, l'alcool à 96 p. 100, la chaleur à 60°, à 100°, à 120° et l'N-HCl, par G F, G Al₅₀, G Al₉₆, G 100°, G 120°, G N-HCl et les sérum agglutinants correspondants par S. G F, S. G Al₅₀, S. G Al₉₆, S. G 60°, S. G 100°, S. G 120° et S. G N-HCl.

B. — DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE DES ANTIGÈNES M, K ET O.

Des réactions d'agglutination sont pratiquées sur lame et par centrifugation, en présence de G F, G Al₉₆ et G N-HCl, avec les sérum suivants :

S. G F

S. G F saturé par des G N-HCl : S. M K

S. M K saturé par des G Al₉₆ : S. M

S. G Al₉₆

S. G Al₉₆ saturé par des G N-HCl : S. K

S. G N-HCl : S. O₁

Sérum préparé avec l'extrait T.C.A. : S. O₂

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I.

Sérum	G. F		G Al ₉₆		G N-HCl	
	G	L	C	L	C	L
S. G F	512	256	2.560	1.280	2.560	1.280
S. M K	512	256	640	320	-	-
S. M	512	256	-	-	-	-
S. G Al ₉₆	-	-	2.560	640	2.560	1.280
S. K	-	-	640	320	-	-
S. O ₁	-	-	640	320	1.280	320
S. O ₂	-	-	1.280	320	640	160

C : agglutination par centrifugation.

L : agglutination sur lame.

- : agglutination négative au 1/20.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE DE *M. PSEUDO-MALLEI* 475

Le sérum *M* n'agglutine que les G F, le sérum *K* n'agglutine que les G Al₉₆ et le sérum *O*₁ agglutine les G Al₉₆ et les G N-HCl à des taux sensiblement égaux.

Nous nous proposons de montrer que :

1° L'agglutination des G F par le S. *M* est une agglutination due à l'antigène *M* ;

2° L'agglutination des G Al₉₆ par le S. *K* est une agglutination due à l'antigène *K* ;

3° L'agglutination des G N-HCl par le S. *O*₁ est une agglutination due à l'antigène *O*.

TABLEAU II. — Inhibition de l'agglutination des G N-HCl par les sérum *O*₁ et *O*₂ après saturation des agglutinines par des G N-HCl (*R*₁) et par un extrait T.C.A. (*R*₂).

S E R U M *O*₁ (titre sur lame : 1/320)

Dilutions :	1/20			1/40			1/60			1/160			T ₁	T ₂	
Gouttes :	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	0.	0		
eau physiologique	V	0	0	V	0	0	V	0	0	V	0	X	V		
G N-HCl (en milliards de gènes contenus dans V gouttes)	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
Extrait T.C.A. (sol. en eau physiologique).	0	0	V	0	0	V	0	0	V	0	0	V			
2 h. à 37° ; centrifugation 30 minutes à 2.500 t/m.															
Surnageants : (gouttes)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
G N-HCl (1.10 ⁹ g/ml) :	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
Agitation 20 minutes sur lame.															
Résultats :	Dilutions:	1/80			1/160			1/320			1/640			T ₁	T ₂
	Agglutinations :	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	-	-
		++	+	+	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

S E R U M *O*₂ (titre sur lame : 1/160)

Même technique que pour le sérum *O*₁

Résultats :	Dilutions :	1/40			1/80			1/160			1/320			T ₁	T ₂
	Agglutinations :	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	T+	R ₁	R ₂	-	-
		++	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

— : négatif au 1/20.

1^o ANTIGÈNE O. — L'extrait trichloracétique d'un bacille Gram-négatif cilié, comme le bacille de Whitmore, correspond, d'après Boivin et Mesrobeau, à l'antigène somatique *O*. Nous considérons donc que le sérum *O*₂ est un sérum anti-*O*.

Pour montrer l'identité des agglutinines des sérums *O*₁ et *O*₂, nous avons saturé des dilutions en progression géométrique de raison 2 de ces deux sérums par des quantités déterminées de G N-HCl et d'extrait T. C. A. jusqu'à disparition des agglutinines anti-G N-HCl.

La technique est indiquée dans le tableau II.

Les résultats obtenus montrent que les agglutinines anti-G N-HCl des sérums *O*₁ et *O*₂ sont, à titre égal, saturées par des quantités comparables de G N-HCl d'une part et d'extrait T. C. A. d'autre part. Ces agglutinines sont donc identiques et correspondent à l'antigène *O* du bacille de Whitmore.

2^o ANTIGÈNE D'ENVELOPPE K. — D'après les résultats précédents, l'agglutination des G N-HCl par le S. G Al₉₆ est une agglutination *O*; elle disparaît après saturation de ce sérum par des G N-HCl, alors que persiste une agglutination à 1/640 par centrifugation et à 1/320 sur lame pour des G Al₉₆.

Ainsi est établie l'existence d'un antigène détruit par N-HCl et différent de l'antigène *O*. On peut penser qu'il s'agit de l'antigène d'enveloppe *K*; il détermine en effet, ainsi que nous le verrons par ailleurs, une *O*-inagglutinabilité qui est fonction de la dissociation *O* (*R*) *K* → *O* (*R*) *Km*.

3^o ANTIGÈNE MUQUEUX M. — Il apparaît sur le tableau I que les G F ne sont agglutinés ni par le S. *K* ni par le S. *O*₁. Cette *K*-et *O*-inagglutinabilité est déterminée par un troisième antigène qui est l'antigène muqueux *M*.

Après saturation du S. G F par des G N-HCl pour éliminer les agglutinines *O* (S. *MK*), puis par des G Al₉₆ pour éliminer les agglutinines *K*, on obtient un S. *M* qui agglutine des G F à 1/512 par centrifugation et à 1/256 sur lame.

4^o CONCLUSION. — L'obtention d'extraits *M* et *K* par des moyens chimiques permettrait d'établir leurs relations avec les sérums *M* et *K* à l'aide de réactions d'inhibition de l'agglutination comparables à celles employées pour l'antigène *O*. Des essais d' extraction sont en cours.

Nous pouvons cependant, en nous basant sur les inagglutinabilités qui résultent de la position des antigènes *M*, *K* et *O* dans la cellule bactérienne, conclure que trois antigènes entrent dans la constitution de *Malleomyces pseudo-mallei*. Ce sont, en allant de la périphérie vers le centre :

- a) Un antigène muqueux *M*, non altéré par le formol à 0,5 p. 100, détruit par l'alcool éthylique à 96 p. 100 et par l'acide chlorhydrique normal ;
- b) Un antigène d'enveloppe *K*, non altéré par le formol à 0,5 p. 100, ni par l'alcool éthylique à 96 p. 100 mais détruit par l'acide chlorhydrique normal ;
- c) Un antigène somatique *O*, résistant à l'acide chlorhydrique normal et semblable à celui des bactéries Gram-négatives.

Nous pouvons ainsi, dès à présent, interpréter les résultats du tableau I de la façon suivante (V. tableau III).

TABLEAU III.

Sérum	Titres (centrifugation)		
	<i>M</i>	<i>K</i>	<i>O</i>
S. G F	+ 512	+ 640	+ 2.560
S. G Al ₉₆	-	+ 640	+ 2.560
S. G N-HCl	-	-	+ 1.280

L'existence des trois antigènes *M*, *K* et *O* étant établie, il nous reste à les caractériser d'une façon plus précise en étudiant le comportement de leur pouvoir antigène, de leur pouvoir fixateur des agglutinines et de leur agglutinabilité après traitement par l'alcool éthylique à 50 p. 100 et 96 p. 100, par l'N-HCl et après chauffage à 60°, 100° et 120°.

C. — PROPRIÉTÉS DE L'ANTIGÈNE *K*.

1° AGGLUTINABILITÉ. — L'agglutination par centrifugation et sur lame de suspensions de bacilles de Whitmore :

Traités par l'alcool 50 %	G Al ₅₀
Traités par l'alcool 96 %	G Al ₉₆
Chauffés deux heures et demie à 100°	G 100°
Chauffés deux heures à 120°	G 120°
Traités par N-HCl	G N-HCl

par un sérum G Al₉₆ saturé par des G N-HCl [S. K (Al₉₆)], donne les résultats indiqués dans le tableau IV.

Par centrifugation, on obtient avec les suspensions de G Al₅₀, de G Al₉₆ et surtout celles de G 100° et de G 120°, une agglutination en « crêpe », comparable à celle de l'antigène de surface

d'*Escherichia coli*. Ces quatre suspensions sont également agglutinables (1/640).

La technique d'agglutination sur lame est moins sensible, en particulier pour les G 100° et 120° ; elle est caractérisée par des agglutinats qui apparaissent après huit minutes d'agitation.

TABLEAU IV. — Agglutinabilité de l'antigène K.

Antigènes	S é r u m K (Al ₉₆)																	
	Centrifugation (5.10 ⁶ g/ml)							T	Sur lame (1.10 ⁹ g/ml)									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	T	20	40	80	160	320	640	1280	2560	T
G Al ₉₆	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
G Al ₅₀	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
G 100°	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	++	+	+	+	+	-	-	-	-
G 120°	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
G N-HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2° POUVOIR FIXATEUR DES AGGLUTININES. — Le pouvoir fixateur des agglutinines des G Al₅₀, G 100° et G 120° est évalué par rapport à celui des G Al₉₆ par saturation quantitative d'un sérum K (Al₉₆) d'un titre égal à 1/320 (sur lame).

Les résultats des tableaux V et VI montrent que la quantité minima de G Al₉₆, G Al₅₀, G 100° et G 120° nécessaire pour saturer les agglutinines de ce sérum est égale à 4.10⁹ germes.

Le pouvoir fixateur des agglutinines K des G Al₉₆, G Al₅₀, G 100° et G 120° est donc identique (tableaux V et VI).

3° POUVOIR ANTIGÈNE. — Des sérums K sont préparés par saturation d'un S. G F, d'un S. G Al₅₀, d'un S. G 100° et d'un S. G 120°, par des G N-HCl. Nous les désignerons par : S. K (F), S. K (Al₅₀), S. K (100°) et S. K (120°).

Ces sérums, de même que le S. K (Al₉₆), agglutinent des G Al₉₆ à des taux de 1/640 par centrifugation et de 1/320 sur lame (tableau VII).

Les cinq suspensions possèdent un pouvoir antigène sensiblement égal.

D. — PROPRIÉTÉS DE L'ANTIGÈNE M.

1° AGGLUTINABILITÉ. — Le pouvoir fixateur des agglutinines de l'antigène K n'étant pas détruit par un chauffage à 100°, on peut

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE DE *M. PSEUDO-MALLEI* 479

TABLEAU V. — Détermination de la quantité minimum de G Al₉₆, nécessaire à la saturation des agglutinines K d'un S.K (Al₉₆).

Technique.

Sérum K (Al ₉₆)	Dilution:	1/10							
	Gouttes :	V	V	V	V	V	V	C	
Eau physiologique	:	0	0	0	0	0	V	X	
G Al ₉₆ (en milliards de germes contenus dans V gouttes)	:	1/2	1	2	4	8	0	0	
	lh. à 37° ; centrifugation 30 minutes à 2.500 t/m								
Surnageants	:	I	I	I	I	I	I	I	
G Al ₉₆ (1.10 ⁹ g/ml)	:	I	I	I	I	I	I	I	
	Agitation pendant 8 minutes sur lame								
Résultats	Dilution:	1/40							
	Taux d'agglutination	++	++	+	-	-	+++	0	

TABLEAU VI. — Pouvoir fixateur des agglutinines des germes traités par l'alcool 50 %, 100° et 120°.

Technique.

S.K(Al ₉₆)	Dilution:	1/10							
	Gouttes :	V	V	V	V	V	V	0	X
Eau physiologique :	:	0	0	0	0	0	0	0	X
Suspensions (en milliards de germes contenus dans V gouttes)	G Al ₉₆ :	0	4	—	—	—	—	—	
	G Al ₅₀ :	2	4	8	10	—	—	—	
	G 100° :	—	—	2	4	8	10	—	
	G 120° :	—	—	—	2	4	8	10	
	lh. à 37° ; centrifugation 30 minutes à 2.500 t/m								
Surnageants	:	I	I	I	I	I	I	I	I
G Al ₉₆ (1.10 ⁹ g/ml)	:	I	I	I	I	I	I	I	I
	Agitation pendant 8 minutes sur lame								
	Dilution:	1/40							
	- G Al ₉₆	—	—	—	—	—	—	—	
	G Al ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	
	G 100°	—	—	—	—	—	—	—	
	G 120°	—	—	—	—	—	—	—	
Résultats	:	T+	4	2	4	8	10	2	To
	+++	-	+	-	-	-	-	+	-

TABLEAU VII. — Pouvoir antigène de l'antigène K.

Sérum	Centrifugation										Sur lame									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	T H-HCl 20	T H-HCl 20	20	40	80	160	320	640	1280	2560	T H-HCl 20	T H-HCl 20
S.K (Al ₉₆)	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
S.K (P)	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
S.K (Al ₅₀)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
S.K (100°)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
S.K (120°)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-

obtenir un sérum *M* dépourvu d'agglutinines *K* en saturant un S. G F par des G 100°.

Ce sérum n'agglutine, par centrifugation et sur lame, que des G F et des G 60° (tableau VIII).

TABLEAU VIII. — Agglutinabilité de l'antigène *M*.

Techniques	S. G F maturé par 100°						
	G F	G Al ₅₀	G Al ₉₆	G 60°	G 100°	G 120°	G H-HCl
Centrifugation	+ 512	-	-	+ 512	-	-	-
Sur lame	+ 256	-	-	+ 256	-	-	-

— : G Al₅₀ : réaction négative au 1/4.

Autres suspensions : réaction négative au 1/20.

Les meilleurs résultats sont obtenus en employant des suspensions de G F, lavées une fois, réglées à 1.10^9 g/ml pour l'agglutination par centrifugation et à 2.10^9 g/ml pour l'agglutination sur lame.

En tube, on obtient des agglutinats partiellement dissociables dans un liquide trouble ; sur lame, ils sont larges et floconneux pour les dilutions les plus faibles.

2° POUVOIR FIXATEUR DES AGGLUTININES. — Le pouvoir fixateur des agglutinines *M* des G Al₅₀, G Al₉₆ et G 60° est déterminé par rapport à celui des G F pour un S. G F saturé par des G 100°.

La technique employée est la même que celle utilisée pour l'antigène *K*.

Le pouvoir fixateur des agglutinines *M* est nul pour les *G Al₉₆*, fortement diminué pour les *G Al₅₀* par rapport à celui des *G F* et des *G 60°* (tableau IX).

TABLEAU IX. — Pouvoir fixateur des agglutinines de l'antigène *M*.

Dilution finale	Sérum M	Sérum M saturé par			
		4.10 ⁹ G F	4.10 ⁹ G 60°	16.10 ⁹ G Al ₅₀	16.10 ⁹ G Al ₉₆
		+ G F (agglutination sur lame)			
1/8	++	-	-	-	++

3° POUVOIR ANTIGÈNE. — Une suspension formolée est agglutinée par centrifugation et sur lame par des *S. G F*, *S. G Al₅₀*, *S. G Al₉₆* et *S. G 60°* saturés par des *G 100°*.

Les résultats donnés par ces agglutinations montrent que les *G F* et les *G 60°* possèdent un pouvoir antigène égal, alors que celui des *G Al₅₀* est diminué et celui des *G Al₉₆* nul (tableau X).

TABLEAU X. — Pouvoir antigène de l'antigène *M*.

Techniques	<i>S. G F</i>	<i>S. G Al₅₀</i>	<i>S. G Al₉₆</i>	<i>S. G 60°</i>
	Saturés par des <i>G 100°</i>			
	+ G F			
Centrifugation	+ 512	+ 64	-	+ 512
Sur lame	+ 256	+ 16	-	+ 256

— : réaction négative au 1/4.

E. — INAGGLUTINABILITÉ DES ANTIGÈNES *K* ET *O*.

La lecture du tableau I montre que le sérum *K* n'agglutine pas une suspension de *G F* et que le sérum *O₁* n'agglutine pas cette suspension, alors qu'il agglutine les suspensions de *G Al₉₆* et de *G N-HCl*.

Ces résultats nous conduisent à étudier dans quelles conditions l'antigène *M* détermine une *K*- et une *O*-inagglutinabilité, et l'antigène *K* une *O*-inagglutinabilité.

1° *K-* ET *O*-INAGGLUTINABILITÉ DUES A L'ANTIGÈNE *M*. — Pour cette étude, nous employons un sérum *K* dépourvu d'agglutinines

TABLEAU XI. — *K* et *O*-inagglutinabilité dues à l'antigène *M*.

Suspensions	Sérum	Centrifugation										T
		20	40	80	160	320	640	1280	2560			
G F (1.10^9 g/ml)	M	++	++	+	+	+	-	-	-			-
	K	+	-	-	-	-	-	-	-			
	O	-	-	-	-	-	-	-	-			
G Al ₅₀ (500.10^6 g/ml)	M	-	-	-	-	-	-	-	-			-
	K	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-			
	O	+	+	++	++	++	++	+	-			
G N-HCl (500.10^6 g/ml)	O	+	++	++	++	++	+	+	-			-

TABLEAU XII. — *O*-inagglutinabilité due à l'antigène *K*.

Sérum	Suspensions (500.10^6 g/ml)	Centrifugation											T
		2	4	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	
G N-HCl	G Al ₅₀	O K m	-	-	+	+	+	++	++	++	+	+	+
		O K	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	G Al ₉₆	O K m	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	-
		O K	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	G 100°	O K m	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
		O K	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	G 120°	O K m	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
		O K	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	G N-HCl	O K m	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
		O K	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-

M, tel un sérum *K* (Al₉₆), et un sérum *O* préparé avec des G N-HCl.

Des suspensions de G F, G Al₅₀, G N-HCl sont agglutinées comparativement par ces sérum *K* et *O*, et par un sérum *M*.

Les résultats du tableau XI montrent que l'antigène *M* détermine une *K*- et une *O*-inagglutinabilité.

2^o O-INAGGLUTINABILITÉ DUE A L'ANTIGÈNE *K*. — Par contre, il semble que l'antigène *K* ne détermine pas d'*O*-inagglutinabilité ; les suspensions de G Al₉₆ et de G N-HCl sont en effet agglutinées à un titre égal par le sérum *O*.

L'influence de la présence de l'antigène *K* sur l'agglutinabilité de l'antigène *O* dépend, en réalité, de l'importance de la dissociation *O K* → *O K m* → *O*.

Nous donnons, à titre d'exemple, les résultats que nous avons obtenus en agglutinant par un S. G N-HCl des suspensions microbiennes préparées à partir d'une culture très dissociée (*O K m*) et peu dissociée (*O K*) [tableau XII].

Une culture peu dissociée peut être *O*-inagglutinable sous la forme d'une suspension de G Al₅₀ et hypoagglutinable sous la forme de suspension de G Al₉₆ ou de G chauffés. On remarque également l'existence d'un phénomène de zone avec les germes *O K m* traités par l'alcool à 50 p. 100.

L'agglutination *O* est granulaire ; elle est tardive sur lame où elle est maximum après vingt minutes d'agitation.

Le pouvoir fixateur des agglutinines *O* de ces suspensions est inversement proportionnel à leur *O*-inagglutinabilité.

Leur pouvoir antigène est sensiblement égal, comme l'indique le tableau XIII.

TABLEAU XIII. — Pouvoir antigène de l'antigène *O*.

Techniques	S. G P	S. G Al ₅₀	S. G Al ₉₆	S. G 100°	S. G 120°	S. G N-HCl
	+ G N-HCl					
Centrifugation (500.10 ⁶ g/ml)	+ 2560	+ 1280	+ 2560	+ 2560	+ 2560	+ 1280
sur lame (1.10 ⁹ g/ml)	+ 1280	+ 320	+ 1280	+ 1280	+ 1280	+ 320

CONCLUSIONS.

L'étude des différentes formes de culture de *Malleomyces pseudomallei* suggère l'existence de trois antigènes : un antigène muqueux *M*, un antigène d'enveloppe *K* et un antigène somatique *O*.

Nous avons démontré leur existence par des épreuves sérologiques basées sur leur différence de sensibilité à l'action du

formol, de l'alcool éthylique, de la chaleur et de l'acide chlorhydrique normal et sur les inagglutinabilités qu'ils déterminent.

Les propriétés de l'antigène *M* du bacille de Whitmore sont semblables à celles de l'antigène *M* des *Enterobacteriaceae*. Cet antigène donne une agglutination partiellement dissociable en tubes, rapide sur lame. Il détermine une *K*- et une *O*-inagglutinabilité.

L'antigène *K* se comporte comme un antigène d'enveloppe. Il donne une agglutination en « crêpe » par centrifugation, totale et immédiate sur lame. Il détermine une *O*-inagglutinabilité ou hypoagglutinabilité variable suivant l'importance de la dissociation $O\ K \rightarrow O\ K\ m \rightarrow O$, et qui peut être totale avec une suspension de germes traités par l'alcool à 50 p. 100.

L'antigène somatique *O* est comparable à celui des bactéries Gram-négatives. Il donne une agglutination granulaire par centrifugation, tardive sur lame.

La sensibilité de ces trois antigènes aux agents physico-chimiques est indiquée par le tableau XIV.

TABLEAU XIV. — Sensibilité des antigènes *M*, *K* et *O*
aux agents physico-chimiques.

Traitemen t par	Antigènes	Agglutinabilité	Pouvoir fixateur des agglutinines	Pouvoir antigène
Formol 0,5 %	<i>M</i>	+	+	+
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
Alcool 50 %	<i>M</i>	-	(+)	(+)
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
Alcool 96 %	<i>M</i>	-	-	-
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
1 h. à 60°	<i>M</i>	+	+	+
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
2 h. 1/2 à 100°	<i>M</i>	-	-	-
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
2 h. à 120°	<i>M</i>	-	-	-
	<i>K</i>	+	+	+
	<i>O</i>	+	+	+
N - HCl	<i>M</i>	-	-	-
	<i>K</i>	-	-	-
	<i>O</i>	+	+	+

+ : conservé. (+) : diminué. — : détruit.

SUMMARY

The study of the different culture types of *Malleomyces pseudomallei* suggests the existence of three antigens: a mucoid antigen M, a capsular antigen K and a somatic antigen O.

The authors have demonstrated their existence by serological tests based upon their difference in sensitivity to the action of formol, ethyl alcohol, heat and normal hydrochloric acid and upon inagglutinabilities caused by these antigens.

The properties of the M antigen of Whitmore's bacillus are similar to those of the M antigen of the *Enterobacteriaceae*. This antigen produces an agglutination which may be partially dissociated in tubes and appears rapidly on slides. It causes K and O-inagglutinability.

Antigen K behaves like a capsular antigen. It gives a « crape type » agglutination on centrifugation, total and immediate on slides. It determines an O-inagglutinability or hypo-agglutinability variable according to the extent of the dissociation $OK \rightarrow OKm \rightarrow O$, which can be total with a bacterial suspension treated with 50 % alcohol.

The somatic antigen O is comparable to that of the Gram-negatives. It gives granular agglutination by centrifugation, tardy on slides.

Nous remercions M^{lle} A.-M. Staub et M. L. Le Minor, Chefs de Laboratoire du Service des Vaccins de l'Institut Pasteur, dont les conseils nous ont été précieux pour mener à bien cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **412**, 76.
- [2] FELIX (A.) et PITTE (R. M.). *J. Hyg.*, 1951, **49**, 92.

SUR LES PROCESSUS DE CONJUGAISON

ET DE RECOMBINAISON CHEZ *ESCHERICHIA COLI*.

I. — L'INDUCTION PAR CONJUGAISON OU INDUCTION ZYGOTIQUE.

par FRANÇOIS JACOB et ÉLIE L. WOLLMAN (*)

(*Service de Physiologie microbienne, Institut Pasteur, Paris*)

L'existence de phénomènes de recombinaison génétique chez les bactéries a été démontrée pour la première fois par Tatum et Lederberg [1] avec la souche K12 d'*Escherichia coli*. Le principe des expériences consiste à étaler sur un milieu synthétique minimal un mélange de deux souches de bactéries *auxotrophes*, c'est-à-dire incapables de synthétiser un ou plusieurs facteurs de croissance différents. Dans ces conditions, on obtient, à raison d'environ 1 pour 10^6 de chacun des types parentaux, des colonies *prototrophes* (c'est-à-dire capables de se développer en l'absence de facteurs de croissance) dont on peut démontrer qu'elles sont le résultat d'une recombinaison génétique entre bactéries parentales. Si, en effet, ces bactéries diffèrent entre elles, non seulement par des caractères utilisés comme sélecteurs, mais aussi par d'autres caractères qui n'interviennent pas dans la sélection (tels que pouvoir de synthèse, sensibilité à des bactériophages ou à des antibiotiques, utilisation de glucides), on observe, parmi les recombinants prototrophes, un réassortiment de ces caractères. En variant, chez les types parentaux, la distribution des caractères non sélectionnés et les modes de sélection, il a été possible d'établir l'existence de liaisons entre les différents caractères étudiés. Ultérieurement, des difficultés ont surgi lorsqu'il a été tenté d'établir une carte génétique de ces caractères [2, 3].

La recombinaison génétique chez *Escherichia coli* K12 présente certaines caractéristiques qui conditionnent la méthodologie et rendent délicate l'analyse du phénomène : 1° la faible fréquence de recombinaison observée dans les croisements usuels (10^{-5} à 10^{-6}) oblige à sélectionner certaines classes de recombinants ; 2° les colonies de recombinants que l'on étudie représentent la descendance des individus recombinants sélectionnés.

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} mai 1956.

Un progrès extrêmement important est dû à Hayes qui démontra que, dans un croisement, les deux souches mises en œuvre ne jouent pas un rôle identique. D'une part, la stérilisation de l'une des souches (dite *donatrice* ou F^+) par la streptomycine n'empêche pas la recombinaison génétique, alors que la stérilisation de l'autre souche (dite *réceptrice* ou F^-) empêche la formation de recombinants [4]. D'autre part, la contribution génétique des deux souches, aux recombinants, est inégale : la plupart des caractères non sélectionnés que l'on retrouve chez les recombinants sont ceux de la souche F^- réceptrice [5].

La découverte, faite indépendamment par Cavalli d'une part [6] et par Hayes d'autre part [7], de certaines souches présentant une haute fréquence de recombinaison (et appelées pour cela Hfr), illustre d'une manière particulièrement frappante la contribution inégale des deux parents à la constitution génétique des recombinants. Avec la souche isolée par lui, Hayes a pu démontrer que la haute fréquence de recombinaison ne portait que sur un nombre limité de caractères, les autres caractères n'apparaissant pas, parmi les recombinants, avec une fréquence supérieure à celle que l'on observe dans les croisements $F^+ \times F^-$ [7].

Deux groupes d'hypothèses ont été avancés pour rendre compte des particularités de la recombinaison génétique chez *E. coli* K12. Selon Lederberg [8], la recombinaison génétique chez *E. coli* K12 ne diffère pas fondamentalement des processus sexuels tels qu'ils existent chez d'autres organismes : formation d'un *zygote complet* et ségrégation. L'inégale contribution génétique des deux parents aux recombinants, serait due à l'élimination d'un segment chromosomique, postérieure à la formation du zygote.

Selon Hayes [7], il n'y aurait pas constitution d'un zygote complet mais seulement *transfert d'un segment* plus ou moins important du matériel génétique de bactérie donatrice à bactérie réceptrice, avec formation ultérieure de recombinants. Cette hypothèse élimine toute possibilité d'obtenir, à partir d'un tel zygote incomplet, les recombinants réciproques et les deux types parentaux.



La souche sauvage d'*E. coli* K12 est lysogène ; différents mutants non lysogènes, c'est-à-dire ne perpétuant pas le prophage λ , ont pu être isolés [9]. Il est ainsi devenu possible, par des croisements entre bactéries lysogènes et non lysogènes, d'étudier le déterminisme génétique de la lysogénie. Ces croisements ont montré que le caractère lysogène ségrgeait parmi les recombinants et qu'il était lié à certains loci gouvernant l'utilisation du galactose [10, 11]. Par des croisements mettant en œuvre deux souches lysogènes, mais dont chacune perpétue un prophage λ

différent, Appleyard a pu démontrer que le déterminant génétique de la lysogénie était le prophage lui-même [12].

L'utilisation de souches de signes connus révéla cependant qu'il existe une remarquable asymétrie dans les croisements [11, 12] : alors que les caractères lysogène ou non lysogène du parent F⁺ sont transmis aux recombinants lorsque le parent F⁻ est lysogène, ce n'est qu'exceptionnellement que le caractère lysogène du parent F⁺ apparaît parmi les recombinants lorsque le parent F⁻ n'est pas lysogène.

La faible fréquence de recombinaison observée dans les croisements F⁺ × F⁻ rendait cependant malaisée l'analyse de ce phénomène.

Grâce à l'obligeance de W. Hayes, qui a bien voulu mettre à notre disposition les souches Hfr obtenues par lui, nous avons pu reprendre l'étude du comportement du caractère lysogène au cours des croisements entre bactéries Hfr et bactéries F⁻. Certains résultats obtenus au cours de cette étude ont déjà fait l'objet de notes préliminaires [13, 14].

Dans le présent mémoire sera décrit le phénomène d'induction zygotique : dans un croisement entre bactéries Hfr lysogènes et bactéries F⁻ non lysogènes, le transfert du prophage λ des bactéries Hfr aux bactéries F⁻ aboutit au développement du prophage en phage végétatif et à la lyse de la bactérie réceptrice. Ce phénomène, dont les conséquences génétiques seront examinées dans un second mémoire [15], offre un moyen d'étude de la conjugaison et du transfert de matériel génétique indépendant des processus ultérieurs qui aboutissent à la formation de recombinants génétiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

A. SOUCHES *d'Escherichia coli* K12. — Afin de pouvoir réaliser des croisements entre bactéries lysogènes et bactéries non lysogènes dans toutes les combinaisons possibles, il a été nécessaire de mettre au point une technique de « guérison » des souches lysogènes.

1^o *Isolement des mutants non lysogènes.* Les mutants non lysogènes ont été isolés parmi les bactéries survivantes à une forte irradiation par la lumière ultraviolette (10^{-5} survivants). Après l'irradiation, les bactéries sont agitées en milieu liquide nutritif et en présence d'un immunosérum anti-λ pendant un temps suffisant à l'expression du caractère (trois heures). Des échantillons sont alors étalés sur gélose nutritive et le caractère lysogène ou non des colonies formées est recherché par « impression », avec un tampon de velours [16] sur des boîtes de gélose ensemencées avec des bactéries sensibles au phage λ. Les colonies ne produisant pas de phages, présentes à raison d'environ 1 pour 500 à 1 000 colonies, sont ensuite réisolées et l'on précise leur caractère non lysogène ou défectif [17] par les méthodes usuelles.

2^e Origine des souches. Les principales souches utilisées dans ce travail sont énumérées sur le tableau I. Certaines d'entre elles sont issues de la lignée Y10 [1] ou de son dérivé classique W677, les autres de la souche Hfr isolée par Hayes [7].

TABLEAU I. — Souches d'*Escherichia coli* utilisées.

Désignation	Caractères	Origine : référence
E.coli K12		
Y10	F ⁻ T ⁻ L ⁻ B ₁ ⁻ (λ) ⁺	(1)
O600	F ⁻ T ⁻ L ⁻ B ₁ ⁻ T ₁ rLac ⁻ (λ) ⁻	(12)
P14	F ⁻ T ⁻ L ⁻ B ₁ ⁻ T ₁ rLac ⁻ (λd ₁)	(17)
112	F ⁺ C ⁻ H ⁻ T ₁ rGal _a ⁻ (λ) ⁻	(11)
P678	F ⁻ T ⁻ L ⁻ B ₁ ⁻ T ₁ rLac _b ⁻ Gal _b ⁻ Mal ⁻ Xyl ⁻ Mtl ⁻ Ara ⁻ (λ) ⁻ /λ	W677 F ⁻ (5)
Hfr ₄	B ₁ ⁻ (λ) ⁺	Hfr (7)
E.coli C	F ⁻ prototrophe	(19)

La souche P678 mérite une mention spéciale. Elle a été obtenue à partir de la souche W677 par réversion du caractère galactose⁻, sélection, après irradiation par la lumière ultraviolette, d'un mutant galactose⁻ lié au prophage λ, et « guérison » par le rayonnement U. V. Le caractère galactose⁻ de cette souche (*gal b*) est différent du caractère galactose⁻ de la souche 112 [11]. A partir de la souche P678, différents mutants ont été isolés, en particulier des mutants résistants à la streptomycine.

3^e Nomenclature. Comme il est d'usage, on indique par un signe — la perte d'un pouvoir de synthèse (*T* thréonine, *L* leucine, *B₁* thiamine, *M* méthionine) ou l'incapacité à utiliser un glucide (*lac* lactose, *gal* galactose, *mal* maltose, *xyl* xylose, *man* mannitol), et l'allèle sauvage par le signe +. De même, on indique par *s* la sensibilité et par *r* la résistance à un antibiotique (*S* streptomycine, *Az* nitrure de sodium) ou à un bactériophage (*T₁*, *T₃*, *T₆*).

Pour faciliter la nomenclature, lorsqu'une même souche est utilisée tantôt sous une forme, tantôt sous une autre, son appellation n'est pas modifiée. Nous utiliserons ainsi P678 Ss et P678 Sr (ou Hfr Ss et Hfr Sr). De même nous appellerons P678(λ)+ la souche lysogène pour λ et P678(λ)- la souche non lysogène (tableau I). Enfin, l'incapacité à adsorber un phage tel que λ sera représentée par le symbole /λ : exemple P678/λ.

B. LE BACTÉRIOPHAGE λ. — Les techniques utilisées dans l'étude du bactériophage λ, les propriétés de ce phage et les divers mutants qui en ont été dérivés ont déjà été décrits [18].

C. MILIEUX. — Milieux nutritifs liquide (bouillon peptoné) et solide (milieu gélosé à 10 g p. 1 000 pour l'étalement des bactériophages,

à 20 g p. 1 000 pour l'étalement des bactéries) ont été également décrits ainsi que le tampon utilisé [48].

D. TECHNIQUE DE CROISEMENTS. — Dans les croisements entre bactéries Hfr et F⁻, la haute fréquence de recombinaison ne porte que sur un groupe de caractères (T, L, Az, T₁, Lac). Des caractères tels que streptomycine (S), qui ne sont pas situés sur ce segment, n'interviennent donc pas dans la recombinaison. C'est ainsi que, dans un croisement Hfr M⁻ × F⁻T⁻L⁻B⁻, tous les recombinants T⁺L⁺M⁺ ont le caractère S du parent F⁻: ils sont Ss si le parent F⁻ était Ss; ils sont Sr si le parent F⁻ était Sr [7]. On peut donc distinguer les caractères *sélectionnés* qui sont transmis des bactéries Hfr aux recombinants (les caractères T⁺L⁺ par exemple) et les caractères *contre sélectionnés* dans le but d'empêcher la croissance des bactéries Hfr ou d'inactiver celles-ci. C'est le cas de la streptomycine qui, dans un croisement Hfr Ss × F⁻ Sr permet d'éliminer les bactéries Hfr sans nuire à l'expression des recombinants. Le caractère gal_b et le prophage λ sont l'un et l'autre situés sur le segment transmis à haute fréquence des Hfr aux recombinants [43, 44].

Sauf indications contraires, les croisements réalisés le seront entre bactéries Hfr Ss et F⁻Sr/λ (souche P678). Dans la pratique, des cultures en voie de croissance exponentielle des bactéries à croiser sont centrifugées et remises en suspension en bouillon. A temps 0, les deux souches sont mélangées de manière à ce que la concentration finale soit de 4.10⁸ bactéries F⁻/ml et de 2.10⁷ bactéries Hfr/ml (rapport Hfr/F⁻ = 1/20). A temps variables, des échantillons sont prélevés, dilués en tampon, puis étalés sur milieu convenable: milieu synthétique gélosé sélectif pour les recombinants, gélose nutritive complète en présence de bactéries indicatrices (112 Sr) avec 100 γ de Sm/ml ou sans Sm pour les centres infectieux. Dans les deux cas, les nombres obtenus sont rapportés au nombre de bactéries ajoutées en minorité (généralement le Hfr) au temps 0. On appellera *fréquence nombre de recombinants de recombinaison* le rapport $\frac{\text{nombre de recombinants}}{100 \text{ bactéries Hfr initiales}}$ et *taux d'induction* le rapport $\frac{\text{nombre de centres infectieux}}{100 \text{ bactéries Hfr initiales}}$.

Des indications concernant plus particulièrement le matériel ou les techniques utilisés dans chacune des trois parties de ce travail seront fournies au début du chapitre correspondant.

Résultats expérimentaux.

I. — COMPORTEMENT DU PROPHAGE λ AU COURS DES CROISEMENTS ENTRE BACTÉRIES LYSOGÈNES ET BACTÉRIES NON LYSOGÈNES.

Nous avons indiqué que, dans les croisements F⁺ × F⁻ entre bactéries lysogènes et bactéries non lysogènes, les résultats obtenus diffèrent selon que le caractère lysogène est porté par la souche F⁻ ou par la souche F⁺: lorsque c'est la souche F⁻ qui est lysogène, le caractère (λ)⁻ du parent F⁺ apparaît dans

une certaine proportion des recombinants ; lorsque c'est la souche F+ qui est lysogène, le caractère $(\lambda)^+$ de cette souche (et le caractère gal qui lui est lié) ne sont pratiquement jamais transmis aux recombinants [41, 42]. On pouvait émettre l'hypothèse que cette absence de transfert du caractère lysogène était la conséquence de l'induction, au cours du croisement, du développement du prophage en phage végétatif. C'est ce que confirment les expériences mettant en œuvre les bactéries Hfr lysogènes.

A. CROISEMENTS ENTRE BACTÉRIES Hfr LYSOGÈNES ET F- NON LYSOGÈNES. — On mélange, dans les conditions habituelles d'un croisement, des bactéries Hfr(λ)+Ss ($2 \cdot 10^7$ /ml) et des bactéries F-(λ)-Sr/ λ ($4 \cdot 10^8$ /ml). Le mélange est agité au bain-marie à 37° et des échantillons, prélevés à temps variables, sont dilués et étalés sur gélose avec des bactéries indicatrices 112 Sr, avec ou sans streptomycine (100 γ /ml). Un tube témoin ne contenant que des bactéries Hfr(λ)+Ss est traité de la même manière. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur le tableau II.

TABLEAU II. — Induction zygotique dans les croisements entre Hfr lysogènes et F- non lysogènes.

Etalement à t = (mn)	Centres infectieux pour 100 Hfr initiaux							
	Témoin		Croisement		Témoin		Croisement	
	Hfr(λ)+Ss	Hfr(λ)+Ss x F-(λ)-Sr/ λ	Hfr(λ)+Sr	Hfr(λ)+Sr x F-(λ)-Ss/ λ	sans Sm	avec Sm	sans Sm	avec Sm
0	1,8	0,17	2	0,09	2,7		3	2,9
20	3,2	0,51	18	17,5	4,6		19	4,9
40	5,7	0,68	42	37	5,3		47	6,3
60	7,8	1,08	55	52	7,1		58	7,8

Les deux croisements réciproques :

Hfr(λ)+Ss x F-(λ)-Sr/ λ et Hfr(λ)+Sr x F-(λ)-Ss/ λ sont réalisés dans les conditions standard. A des temps variables, des échantillons sont dilués et étalés en présence de bactéries indicatrices Sr, sur gélose contenant ou non de la streptomycine.

Sur les boîtes additionnées de streptomycine, le nombre des centres infectieux formés par les échantillons provenant du mélange Hfr(λ)+Ss x F-(λ)-Sr/ λ (qui, au temps 0, correspond à environ 1/1 000 du nombre de bactéries Hfr) augmente régulièrement en fonction du temps jusqu'à atteindre, après une heure, environ 50 p. 100 du nombre initial de Hfr. Au contraire, le nombre de plages formées par les échantillons provenant du

tube témoin ne représente, après soixante minutes, qu'environ 1 p. 100 du nombre de Hfr initiaux. Encore s'agit-il de plages petites et inégales, bien différentes des plages caractéristiques des centres infectieux formés par les échantillons provenant du tube de croisement.

En l'absence de streptomycine, les résultats sont essentiellement les mêmes, à ceci près, qu'au temps 0, aussi bien pour les échantillons provenant du mélange que du témoin, le fond de plages petites et irrégulières, dues à la croissance résiduelle des bactéries Hfr sur la boîte, est beaucoup plus important [près de 10 p. 100 du nombre initial de Hfr] (1). Pour les échantillons prélevés plus tard, à partir du mélange, les petites plages sont progressivement remplacées par des plages régulières et bien formées, caractéristiques des centres infectieux, qui, à soixante minutes, atteignent encore 50 p. 100 environ du nombre de bactéries Hfr initiales.

On peut conclure de cette expérience que, lorsque l'on mélange des bactéries Hfr(λ)⁺ avec des bactéries F-(λ)-/ λ , le développement du prophage de la moitié environ des bactéries Hfr est induit. On peut démontrer que ce développement du prophage λ des bactéries Hfr(λ)⁺ est bien la conséquence de la conjugaison entre ces bactéries et les bactéries F-(λ)- en réalisant d'une part un mélange Hfr(λ)⁺Ss \times F-(λ)-Sr/ λ et, d'autre part, un mélange Hfr(λ)⁺Sr \times F-(λ)-Ss/ λ , les étalements sur bactéries indicatrices ¹¹²Sr étant réalisés en présence ou en l'absence de streptomycine (tableau II). En l'absence de streptomycine, on constate que, dans les deux cas, plus de la moitié des Hfr forment des centres infectieux. Sur les boîtes contenant de la streptomycine, au contraire, seuls apparaissent les centres infectieux formés au cours du croisement Hfr(λ)⁺Ss \times F-(λ)-Sr. Les plages formées à partir des échantillons provenant du croisement Hfr(λ)⁺Sr \times F-(λ)-Ss/ λ ne diffèrent ni par leur aspect, ni en nombre, des plages formées à partir d'une culture des seules bactéries Hfr(λ) témoin. Cette expérience démontre donc que *le développement du prophage des bactéries Hfr(λ) se fait, non pas dans les bactéries Hfr, mais dans les bactéries réceptrices F-(λ)-/ λ .* L'inactivation de celles-ci par la streptomycine supprime les centres infectieux, tandis que l'inactivation des bactéries Hfr(λ)⁺Ss est sans effet sur la formation des centres infectieux.

Au cours d'un croisement Hfr(λ)⁺Ss \times F-(λ)-Sr/ λ , on peut, par étalement sur ¹¹²Sr + Sm, suivre l'évolution, en fonction du temps, du nombre des centres infectieux produits par les

(1) Ce taux de production spontanée, apparemment très élevé, est dû, en réalité, à « l'induction par conjugaison », sur la boîte, du développement du prophage des bactéries Hfr(λ)⁺.

bactéries $F^-(\lambda)-Sr/\lambda$. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur la figure 1 où l'on voit que le nombre des centres infectieux s'accroît jusqu'à la quarantième minute environ pour

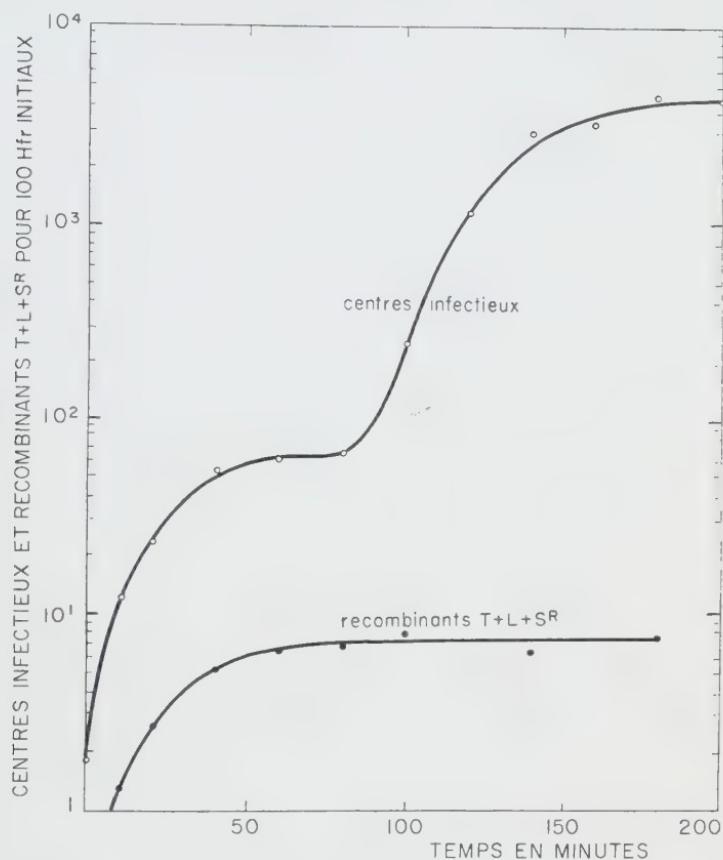


FIG. 1. — *Induction zygotique au cours des croisements $Hfr(\lambda)+Ss \times F^-(\lambda)-Sr/\lambda$.*
A temps 0 sont mélangées les suspensions bactériennes. A des temps variables, des échantillons sont dilués et étalés sur milieu gélosé à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices Sr . En ordonnée, sur une échelle logarithmique, le nombre des centres infectieux pour 100 Hfr initiaux. En abscisse, le temps en minutes. On a représenté également en fonction du temps la courbe d'apparition des recombinants $T+L+SR$ résultant de la transmission des caractères $T+L+$ du parent Hfr aux recombinants.

atteindre un plateau qui correspond à environ 50 p. 100 du nombre initial de bactéries Hfr . A partir de la quatre-vingtième minute, le nombre de centres infectieux s'élève à nouveau pour atteindre, à cent cinquante minutes environ, un second plateau, quatre-vingts

fois plus élevé environ que le premier. Pendant les quarante premières minutes, une dilution de mille fois en bouillon additionné de streptomycine maintient, jusqu'à la quatre-vingtième minute environ, le nombre des centres infectieux au niveau atteint au moment de la dilution. Une fois le premier plateau atteint, la dilution reste sans effet sur l'ascension ultérieure et le second plateau est atteint dans les mêmes conditions que dans une expérience « à cycle unique ». La signification de cette expérience est claire : la première partie de la courbe est une expression de la cinétique de la conjugaison ; le premier plateau correspond à la période latente de développement du prophage en particules infectieuses ; la seconde partie de la courbe correspond à la lyse

TABLEAU III. — Modification phénotypique du phage libéré dans un croisement entre une souche K12 Hfr lysogène et C F⁻ non lysogène.

Croisement	Dilution à t = (mn)	Centres infectieux pour 100 Hfr initiaux		Phages libérés pour 100 Hfr initiaux	
		Etalement à 40 mn sur		Etalement à 200 mn sur	
		K12	C	K12	C
Hfr(λ) ⁺ S ^s x K12F ⁻ (λ) ⁻ S ^r /λ	20	21	23	1320	1260
	40	53	56	3070	3210
Hfr(λ) ⁺ S ^s x CF ⁻ (λ) ⁻ S ^r /λ	20	2,7	21	9,3	1310
	40	5,3	55	17,2	3720

Les bactéries Hfr(λ) + Ss sont mélangées, d'une part, avec des bactéries K12 F⁻(λ)⁻Sr/λ et, d'autre part, avec des bactéries CF⁻(λ)⁻Sr/λ. À des temps variables, les suspensions sont diluées et étalées sur gélose à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices Sr, soit du type K12, soit du type C.

des bactéries F⁻ avec libération de bactériophages λ (rendement moyen 80).

Un autre type d'expérience permet de confirmer que le développement et la maturation du bactériophage λ se font bien dans les bactéries F⁻(λ)⁻/λ réceptrices et non dans les bactéries Hfr(λ)⁺ donatrices. On sait que le phage λ libéré par des bactéries *E. coli* C forme environ mille fois moins de plages sur *E. coli* K12S que sur *E. coli* C, tandis que le phage λ libéré par des bactéries K12 forme autant de plages sur K12 que sur C [19]. On sait, d'autre part, qu'*E. coli* C est F⁻ et capable de recombiner avec K12 F⁺ [20] ou Hfr. Dans l'expérience représentée sur le tableau III, des bactéries Hfr(λ)+Ss ont été croisées, d'une part, avec des bactéries F-K12(λ)-Sr/λ, d'autre part, avec des bactéries C(λ)-Sr/λ. Les centres infectieux formés à vingt et quarante minutes et les phages libérés par la lyse de ces centres

infectieux ont été respectivement étalés sur *E. coli* C et sur *E. coli* K12. Dans le second croisement [Hfr(λ)+Ss \times C(λ)-Sr] un dixième seulement des centres infectieux formés au cours de la conjugaison forment une plage sur K12 et, après la lyse de ces centres infectieux, moins d'une particule libérée sur 200 est capable de former une plage sur K12. Ces particules, dans leur grande majorité, se sont donc développées dans les bactéries F- réceptrices.

**

On peut, de l'ensemble de ces expériences, tirer les conclusions suivantes : au cours d'un croisement entre bactéries Hfr lysogènes et F- non lysogènes, le prophage de plus de la moitié des bactéries Hfr se développe dans les bactéries F-, ce qui aboutit à la lyse de celles-ci avec libération de bactériophages. Le phénomène d'induction zygotique, si facile à démontrer dans le cas des bactéries Hfr lysogènes, l'est beaucoup moins dans celui de bactéries F+ lysogènes. On peut cependant, en prenant des précautions particulières (croisement réalisé en présence de sérum antiphage et de streptomycine), de manière à réduire le plus possible la production spontanée de phage λ par les bactéries F+ (λ) +Ss, montrer que, dans ce cas également, la conjugaison entre bactéries F+ (λ) + et bactéries F- (λ) - peut avoir pour conséquence le développement du prophage des bactéries donatrices dans les bactéries réceptrices. Il est important de noter que, dans les deux cas, le *taux d'induction zygotique*, c'est-à-dire la proportion des bactéries donatrices dont le prophage est induit par la conjugaison, varie dans le même sens que la *fréquence de recombinaison*.

B. CROISEMENT ENTRE BACTÉRIES Hfr ET BACTÉRIES F- LYSOGÈNES.

— 1° *Croisements Hfr(λ)- \times F- (λ) +*. — Dans un croisement entre bactéries Hfr non lysogènes et bactéries F- lysogènes, on n'observe pas, au cours de la conjugaison, d'induction du prophage des bactéries F- (tableau IV). Ceci illustre d'une manière particulièrement frappante la conception de Hayes, selon laquelle le matériel génétique est transmis à sens unique, au cours de la conjugaison, de bactérie donatrice à bactérie réceptrice. Dans ce cas, le prophage λ des bactéries F- se comporte, au cours des croisements, comme un locus génétique quelconque et ségrège normalement parmi les recombinants [14, 15].

2° *Croisements Hfr(λ)+ \times F- (λ) +*. — Non seulement le prophage des bactéries F- lysogènes n'est pas induit dans un croisement, mais sa présence empêche le prophage de bactéries Hfr lysogènes d'être induit par conjugaison. Ceci est particulièrem-

ment facile à démontrer en utilisant une souche F- défective (tableau IV). Lorsque les mêmes bactéries réceptrices F⁻(λd₁)⁺ ont été, avant le croisement, exposées à la lumière ultraviolette, le développement du matériel phagique introduit par conjugaison devient possible (tableau IV).

TABLEAU IV. — Absence d'induction zygotique dans les croisements entre bactéries Hfr et bactéries F- lysogènes.

	Centres infectieux pour 100 parents lysogènes initiaux	Dilution et étalement à t = 20 mn	40 mn
Témoin Hfr(λ) ⁺	0,27	0,41	
" F ⁻ (λ) ⁺	1,2	2,6	
" F ⁻ (λd ₁) ⁺	< 0,01	< 0,01	
<hr/>			
Croisement Hfr(λ) ⁺ x F ⁻ (λ) ⁻	24,8	52,1	
" Hfr(λ) ⁻ x F ⁻ (λ) ⁺	1,4	3,3	
" Hfr(λ) ⁺ x F ⁻ (λd ₁) ⁺	0,36	0,8	
" Hfr(λ) ⁺ x F ⁻ (λd ₁) ⁺ induit	9,1	19,2	

Les différents croisements sont réalisés dans les conditions habituelles, mais dans tous les cas c'est le parent lysogène qui est minoritaire (1/20). Les échantillons prélevés à temps variable sont dilués, puis étalés sur gélose à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices Sr.

II. — MÉCANISME DE L'INDUCTION ZYGOTIQUE.

Les expériences qui viennent d'être décrites démontrent qu'il existe une remarquable asymétrie dans les croisements entre bactéries lysogènes et bactéries non lysogènes, puisque l'induction par conjugaison ne se produit que lorsque c'est le parent F- qui n'est pas lysogène. Lorsque les bactéries F- sont lysogènes, non seulement leur prophage n'est pas induit, mais sa présence confère aux bactéries F- l'immunité contre l'induction zygotique. Le matériel phagique introduit dans une bactérie par conjugaison semble donc se comporter comme un matériel phagique introduit par infection.

Il convient maintenant de rechercher sous quelle forme le matériel phagique est transmis de bactérie donatrice à bactérie réceptrice, et d'examiner les conditions qui permettent à l'induction de se déclencher.

A. TRANSFERT DU PROPHAGE. — On peut démontrer que c'est

bien le *prophage* des bactéries donatrices qui pénètre dans les bactéries réceptrices.

1^o *Absence de transfert d'un phage végétatif ou d'un phage surinfectant.* — Lorsqu'on réalise, dans les conditions habituelles, un croisement entre bactéries Hfr(λ)-Ss infectées par un phage λ et des bactéries F-(λ)-Sr/ λ , on ne constate aucun transfert du phage infectant aux bactéries F-. De même, au cours d'un croisement entre bactéries Hfr(λ)+Ss surinfectées par un phage λ génétiquement marqué et des bactéries F-(λ)-Sr/ λ , ces bactéries ne libèrent que le type de phage λ issu du prophage, à l'exclusion du type surinfectant (tableau V).

TABLEAU V. — *Absence de transfert de particules surinfectantes végétatives au cours de la conjugaison.*

	Plages pour 100 Hfr initiaux		
	Etalement à t =		
	0 mn	, 40 mn centres infectieux	180 mn phages libérés
Hfr(λ)+ x F-(λ)-/ λ	<0,1	43	2970
Hfr($\lambda g_1^+ c^+$)+ surinfecté par $\lambda g_1^+ c$ x F-(λ)-/ λ	<0,1	{ 38 $g_1^+ c^+$ { 3 $g_1^+ c$	{ 2780 $g_1^+ c^+$ { 23 $g_1^+ c$ { 1 $g_1^+ c$ { 1 $g_1^+ c$
Hfr(λ)+ préinduit x F-(λ)-/ λ	<0,1	4,2	87

Une suspension de Hfr($\lambda g_1^+ c^+$)-Ss est divisée en trois fractions. L'une sert de témoin. La seconde est surinfectée à raison de 67 $\lambda g_1^+ c$ adsorbés en moyenne par bactérie. La troisième est exposée à une dose inductrice optimale de rayonnement U.V. Chacune de ces suspensions est mélangée dans les conditions standard avec des bactéries F-(λ)-Sr/ λ , dans un milieu contenant du sérum anti- λ . A trente minutes, des échantillons sont dilués en milieu nutritif et sont, à des temps variables, étalés sur gélose à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices Sr.

2^o *Absence de transfert d'un prophage induit.* — Lorsque des bactéries Hfr(λ)+ sont, préalablement au croisement, soumises à une dose inductrice de lumière U.V., le prophage induit n'est pas transféré au cours de la conjugaison. Son développement se poursuit dans les bactéries Hfr donatrices et non dans les bactéries F- réceptrices (tableau V).

De ces expériences, on peut conclure que c'est bien le *prophage lui-même qui est transmis de bactéries Hfr lysogènes à bactéries F- non lysogènes*, et que l'induction de ce prophage, comme son développement, ont lieu dans la bactérie réceptrice.

B. FACTEURS DÉTERMINANT L'INDUCTION AU COURS DE LA CONJUGAISON. — L'induction du développement du prophage est-elle la conséquence de son transfert au cours de la conjugaison, ou dépend-elle, au contraire, de certaines propriétés de la bactérie réceptrice ? Dans l'expérience rapportée ci-dessus (tableau IV), nous avons indiqué que le prophage introduit par des bactéries donatrices dans des bactéries réceptrices lysogènes ne se développait pas, mais qu'une irradiation préalable au croisement levait cette immunité. On pouvait penser que le transfert du prophage de bactérie lysogène donatrice à bactérie réceptrice avait, dans tous les cas, pour conséquence le passage du prophage à l'état végétatif, le matériel phagique ainsi transmis se comportant comme celui d'un phage surinfectant [21]. L'analyse des recombinants obtenus dans un croisement $Hfr(\lambda)^+ \times F-(\lambda)^+$, où les deux prophages λ diffèrent par leurs caractères génétiques, démontre que ce n'est pas le cas : le prophage du parent donneur Hfr ségrège parmi les recombinants exactement comme le caractère non lysogène dans les croisements $Hfr(\lambda)^- \times F-(\lambda)^+$ [14, 15].

On peut donc conclure que ce n'est pas le simple transfert d'un segment chromosomique portant un prophage λ qui provoque l'induction de ce prophage, mais que c'est l'état de la bactérie réceptrice qui est en cause. Si la bactérie réceptrice n'est pas lysogène ou si l'immunité a été levée [21], l'induction du prophage dans la bactérie réceptrice se produira immédiatement.

C. RENSEIGNEMENTS APPORTÉS PAR L'INDUCTION DU PROPHAGE λ SUR LE PROCESSUS DE CONJUGAISON. — Il convient maintenant d'examiner brièvement les renseignements que l'induction du prophage λ peut apporter quant au processus de conjugaison lui-même.

Dans un croisement entre bactéries $Hfr(\lambda)^+$ et $F-(\lambda)^-$, le prophage de plus de la moitié des bactéries Hfr est induit par la conjugaison. Le traitement, par la lumière ultraviolette, des produits de la conjugaison (au temps quatre-vingts minutes d'un croisement, figure 1) n'accroît pas le nombre des centres infectieux produits par les bactéries réceptrices. On verra également dans le second mémoire de cette série [15] qu'on ne retrouve que tout à fait exceptionnellement le prophage λ parmi les recombinants (environ $1/10^4$ Hfr). Il y a donc lieu de penser que pratiquement *tout prophage λ transmis d'une bactérie $Hfr(\lambda)^+$ à une bactérie $F-(\lambda)^-$ est immédiatement induit*. Si l'on admet, et ceci semble vraisemblable, que l'induction du prophage λ est, dans la grande majorité des cas, productive, ce prophage se comporte, dans un croisement, comme un caractère létal dont l'expression est immédiate. *Le taux d'induction zygotique cons-*

titue donc une mesure de la fréquence avec laquelle ce caractère génétique particulier est transmis de bactéries donneuses à bactéries réceptrices.

On peut également, grâce à l'induction zygotique, rechercher si plus d'une bactérie Hfr peut se conjuguer avec une bactérie F-. Si, en effet, une même bactérie F- était capable de se conjuguer avec plus d'une bactérie Hfr, le croisement de bactéries F- avec un excès de bactéries Hfr, dont la moitié environ sont lysogènes pour un certain type de phage λ et l'autre moitié pour un autre type de phage λ , devrait donner une certaine proportion de bactéries F- libérant non seulement les deux types de phages λ ,

TABLEAU VI. — Participation d'un seul prophage à l'induction zygotique.

Nombre de Hfr($\lambda m_5 m_1^+$)S ^S / ml	$2,5 \times 10^3$
" " Hfr($\lambda m_5^+ m_1$)S ^S / ml	$3,2 \times 10^8$
" " P678 S ^R / ml	$2,7 \times 10^7$
-----	-----
Nombre total de tubes	92
Nombre de tubes ne contenant pas de phage	47
" " " contenant $m_5 m_1^+$ seul	16
" " " " $m_5^+ m_1$ seul	22
" " " " $m_5 m_1^+$ et $m_5^+ m_1$	7
" " " " autre les types parentaux des types recombinants $m_5 m_1^+$ ou $m_5^+ m_1$	0
-----	-----
Nombre de tubes contenant plus d'une bactérie productrice (d'après la distribution de Poisson)	13

Au temps O sont mélangées des bactéries F- non lysogènes avec un excès de deux types de Hfr lysogènes, les uns perpétuant un prophage $\lambda m_5 m_1^+$, les autres un prophage $\lambda m_5^+ m_1$. A la vingtième minute, la suspension est diluée 10^4 fois dans du bouillon contenant un sérum anti- λ et 100 γ de Sm/ml. Après vingt minutes, cette suspension est diluée dans du bouillon contenant 100 γ de Sm/ml et répartie dans des tubes de manière à ce qu'il y ait une bactérie F- productrice de phage pour 2 à 3 tubes. Après cent cinquante minutes, le contenu de chaque tube est étalé sur gélose à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices Sr.

mais aussi des recombinants [18]. Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur le tableau VI, où l'on voit qu'une bactérie F- ne libère que l'un ou l'autre des types de phage λ et jamais de phages recombinants. Si d'autres causes inconnues n'interviennent pas pour empêcher le transfert et le développement simultané de deux prophages, ce résultat semblerait suggérer

qu'une seule bactérie Hfr peut participer efficacement à la conjugaison.

III. — COMPORTEMENT DE DIVERS PROPHAGES AU COURS DE LA CONJUGAISON.

L'étude génétique de la lysogénie a surtout été réalisée avec le phage λ , isolé à partir de la souche sauvage d'*E. coli* K12. Il était indispensable d'étendre cette étude à d'autres phages tempérés. On sait, en effet, que parmi ceux-ci, certains sont inductibles par des agents tels que la lumière ultraviolette alors que d'autres ne le sont pas. Il convient donc tout d'abord d'examiner les relations qui peuvent exister entre cette inductibilité et le phénomène très particulier que constitue l'induction zygotique. Les propriétés spécifiques des prophages, telles que l'immunité qu'ils confèrent à la bactérie, semblent déjà pouvoir être expliquées par leur localisation génétique et indiquerait que des prophages différents occupent des positions différentes sur le chromosome bactérien. Enfin, le fait que l'induction zygotique d'un prophage tel que λ est une expression immédiate du transfert de ce prophage confère à l'étude de prophages autres que λ un intérêt évident pour la compréhension du processus de conjugaison lui-même.

A. ISOLEMENT DE PHAGES TEMPÉRÉS ACTIFS SUR *E. coli* K12. — A partir de 500 souches d'*E. coli* provenant de fèces humaines (2), nous avons pu isoler 54 phages tempérés actifs sur K12(λ)⁻ ou sur *E. coli* C : 27 d'entre eux étaient actifs à la fois sur K12 et sur C, 5 n'étaient actifs que sur K12 et 22 n'étaient actifs que sur C. Parmi les phages actifs sur *E. coli* K12, un certain nombre ont été utilisés pour préparer des clones lysogènes à partir de souches Hfr(λ)⁻ et F(λ)⁻. Certains de ces phages sont inductibles par la lumière ultraviolette, d'autres ne le sont pas. Parmi les phages inductibles, il en a été trouvé trois qui ne se distinguent de λ par aucun des caractères étudiés : immunité croisée, spectre d'activité, sensibilité à un immunosérum anti- λ . Un certain nombre de phages, tant inductibles que non inductibles, ont été choisis parmi ceux qui ne donnent pas d'immunité croisée. Quelques propriétés de ces phages tempérés sont rapportées sur le tableau VII. On voit, en particulier, que les spectres d'activité des phages inductibles et des phages non inductibles sont, pour les souches indicatrices choisies, nettement distincts (colonnes 1 à 4). Les différents phages inductibles étudiés présentent une

(2) Nous remercions M. Le Minor qui nous a obligeamment fourni ces souches.

TABLEAU VII. — Propriétés de certains phages tempérés actifs sur *E. coli* K12.

Phages	Plaques sur			Taux d'induction U.V. pour 100 batteries irradiées	Taux d'induction par conjugaison pour 100 Hfr initiaux	Inactivation par un serum anti-λ	Recombinaison avec λ	Capacité à transduire <i>gal_b</i> -prophage	Liaison à <i>gal_b</i>	
	K12/λ	K12/82	K12/186							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
82	+	0	+	+	45	65	+	+	0	90
λ	0	+	+	+	> 95	58	+	+	0	80
434	+	0	+	+	> 95	48	+	+	0	70
381	+	0	+	+	45	25	*	*	0	10
21	0	+	+	+	> 95	12	*	+	0	6
424	+	0	+	+	25	9	+	+	0	3
466	+	0	+	+	25	6	*	*	0	1
18	+	+	0	< 1	< 1	0	*	0	0	0
370	+	+	+	0	< 1	0	*	0	0	0
62	+	+	+	0	< 1	< 1	*	*	0	0
363	+	+	+	0	< 1	< 1	0	*	+	0
W	+	+	0	0	< 1	< 1	*	*	0	0
299	+	+	+	0	< 1	< 1	*	*	0	0
186	+	+	0	0	? *	< 1	0	*	0	0

* N'a pas été recherché.

** Exprimée en % des recombinants gal+ qui ont reçu le caractère non lysochrome dans un croisement Hfr gal+ non lysochrome × R- gal- lysochrome (15).

Ces 14 phages ont été choisis pour l'étude génétique de la lysogénie parce qu'ils ne donnent pas d'immunité croisée. Ils sont rangés en deux catégories : inducibles par le rayonnement U.V. en haut ; non-inducibles en bas.

*** Peut être très faiblement inducible.

certaine parenté avec λ tant en ce qui concerne leur sensibilité à un immunsérum anti- λ (colonne 7) que leur capacité à échanger des caractères génétiques avec λ (colonne 8). Leur taux d'induction par la lumière ultraviolette (colonne 5) varie dans d'assez grandes limites. Il est difficile, à l'heure actuelle, d'évaluer la signification de telles différences en raison des nombreux facteurs en jeu. En particulier, chacun de ces phages possède un pouvoir de lysogénisation qui lui est propre et que modifient dans des sens différents certains changements apportés aux conditions extérieures. C'est ainsi que les phages 82 et 381, qui ont un taux de lysogénisation élevé, présentent un taux d'induction faible. A l'inverse, les phages tels que λ ou 21 ont un taux d'induction élevé, mais un taux de lysogénisation beaucoup plus faible. En outre, des changements apportés aux conditions de culture après l'irradiation des bactéries lysogènes peuvent, selon le prophage, modifier de façon inégale la production induite de phages.

B. LOCALISATION GÉNÉTIQUE ET INDUCTIBILITÉ PAR LA LUMIÈRE U. V. — La localisation génétique de ces différents prophages a été recherchée et sera décrite ultérieurement [15]. Il convient cependant de souligner un fait remarquable : tous les prophages inductibles par le rayonnement U. V. sont situés sur le segment transmis à haute fréquence par la souche Hfr de Hayes, tous les prophages non inductibles sont situés sur le segment qui n'est pas transmis à haute fréquence par cette souche Hfr. L'inductibilité par le rayonnement U. V. qui apparaissait déjà comme une propriété génétique d'un prophage donné semble donc être liée à la localisation de ce prophage sur le chromosome bactérien. Il semble exister sur celui-ci des régions spécialisées et chaque prophage occupe, sur un segment donné, une position particulière. C'est ainsi que tous les prophages inductibles étudiés sont liés au caractère *gal_b*, mais ils le sont à des degrés divers (colonne 10 du tableau VII). En utilisant d'autres souches Hfr, capables d'injecter dans les bactéries F- un autre segment du chromosome bactérien [22], on peut montrer que la plupart des prophages non inductibles sont situés sur le segment portant les caractères xylose, mannitol, maltose et streptomycine.

C. COMPORTEMENT AU COURS DES CROISEMENTS ENTRE Hfr LYSOGÈNES ET F- NON LYSOGÈNES. — Diverses souches de Hfr(λ)-, chacune lysogène pour l'un des phages tempérés choisis, ont toutes été croisées avec la souche P678(λ)-Sr dans les conditions habituelles, et l'on a mesuré, dans chaque cas, le taux d'induction zygотique. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans la colonne 6 du tableau VII. On voit qu'ils diffèrent suivant qu'il s'agit de prophages inductibles ou non par le rayonnement U. V.

a) *Tous les prophages inductibles par la lumière U.V.* sont aussi induits par la conjugaison. Le taux d'induction par conjugaison observé dans un croisement Hfr lysogène \times F $^-$ non lysogène est caractéristique du prophage considéré et se retrouve avec une remarquable constance d'une expérience à l'autre. Seuls les résultats obtenus avec les prophages 82 et 381 ont présenté une certaine variabilité, et ceci, selon toute vraisemblance, en raison du pouvoir lysogénisant élevé des phages 82 et 381.

Comme l'indiquent les résultats rapportés sur le tableau VIII,

TABLEAU VIII. — Croisements entre bactéries lysogènes perpétuant chacune un prophage inductible différent.

Croisements	Centres infectieux du type Hfr pour 100 Hfr initiaux
Hfr(λ) $^+$ \times F $^-$ non lysogène	52
" \times F $^-$ (λd_1) $^+$	< 2
" \times F $^-$ (82) $^+$	49
" \times F $^-$ (434) $^+$	54
<hr/>	
Hfr(434) $^+$ \times F $^-$ non lysogène	46
" \times F $^-$ (λd_1) $^+$	47
" \times F $^-$ (82) $^+$	43

Croisements effectués dans les conditions standard. Les échantillons sont étalés sur gélose en présence de bactéries lysogènes indicatrices de l'un ou l'autre type de phage. Les résultats rapportés dans la colonne de droite indiquent la proportion des centres infectieux correspondant au prophage perpétué par le Hfr. On n'observe pas d'augmentation appréciable du nombre des centres infectieux correspondant au prophage perpétué par le F $^-$.

le taux d'induction zygotique d'un prophage donné n'est pas modifié par la présence, dans les bactéries réceptrices, d'un autre prophage non homologue. L'immunité d'une bactérie à l'égard d'un phage est donc la même, que le matériel génétique de ce phage soit introduit par infection ou par conjugaison.

De même, lorsqu'on mélange des bactéries Hfr lysogènes pour deux phages inductibles différents mais capables de se multiplier simultanément dans une même bactérie (par exemple λ et 21) avec des bactéries F $^-$ non lysogènes, on constate que l'induction par conjugaison de chacun des deux prophages est indépendante de la présence de l'autre prophage. Non seulement l'induction d'un prophage donné au cours de la conjugaison n'est pas modifiée par la présence d'un second prophage, mais chacun des prophages est induit à son taux caractéristique.

Enfin, ces expériences mettent en lumière un fait important : le taux d'induction zygotique des prophages étudiés est fonction de leur distance au caractère *gal_b* (colonnes 6 et 10 du tableau VII). Il est d'autant plus élevé que le prophage considéré est plus près de *gal_b*. C'est ainsi que les prophages λ , 434 et 21, tous trois pleinement inductibles par la lumière ultraviolette, peuvent être classés dans le même ordre, aussi bien par leur taux d'induction zygotique (respectivement 58 p. 100, 48 p. 100 et 12 p. 100) que par leur distance au caractère galactose. Dans le cas des prophages 434 et 21, comme dans celui de λ , tout prophage transmis de bactérie donatrice lysogène à bactérie réceptrice non lysogène est immédiatement induit. Les différences observées dans les taux d'induction zygotique sont un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces prophages sont transmis avec des fréquences différentes, fréquences qui sont elles-mêmes fonction de leur position sur le groupe de liaison des bactéries K12.

Ajoutons enfin que, avec les mutants Hfr qui ne transmettent pas aux recombinants le segment galactose [22], on n'observe jamais l'induction de l'un de ces prophages inductibles au cours de la conjugaison.

b) *Aucun des prophages non inductibles par le rayonnement U. V. n'est induit par la conjugaison.* Cette induction ne peut évidemment pas être étudiée avec la souche Hfr utilisée pour ce travail et qui ne transfère pas au F- le segment porteur des prophages non inductibles, mais avec d'autres souches Hfr qui transfèrent ce segment [22]. Au cours de croisements mettant en œuvre l'un de ces Hfr rendu lysogène pour un phage non inductible et un F- non lysogène, le prophage non inductible du parent Hfr n'est pas induit par la conjugaison. Il est normalement transmis aux recombinants parmi lesquels il ségrège de la même façon que le caractère non lysogène dans le croisement inverse Hfr non lysogène \times F- lysogène. Le détail des expériences sur les prophages non inductibles sera publié dans un travail ultérieur.

Discussion.

Lysogénie et conjugaison. — Les anomalies observées dans les croisements entre bactéries lysogènes et bactéries non lysogènes [11, 12] pouvaient laisser subsister quelque doute quant au déterminisme génétique de la lysogénie. Les croisements entre bactéries Hfr et bactéries F- démontrent sans ambiguïté que le déterminant génétique de la lysogénie est bien le prophage lui-même et que ce déterminant génétique est situé sur le chromosome bactérien.

Lorsque le prophage est porté par la bactérie F⁻ réceptrice ou lorsque les deux bactéries, donatrice et réceptrice, sont toutes deux lysogènes pour des mutants d'un même phage tel que λ , le caractère lysogène ségrège dans le croisement et peut être localisé sur le chromosome bactérien [14]. Chacun des prophages étudiés, qu'il soit inducible ou non inducible, occupe une position particulière sur le chromosome bactérien. Cette localisation peut, dans certains cas, être vérifiée et précisée par des expériences de transduction [23]. Il semble même exister, sur le chromosome bactérien, des régions spécialisées puisque des prophages différents localisés sur un même segment possèdent des propriétés communes : c'est ainsi que les divers prophages liés au même caractère *gal_b* sont inducibles et capables d'échanger des caractères génétiques. Les prophages non inducibles, au contraire, paraissent tous localisés dans une autre région.

Si la localisation chromosomique du prophage ne fait plus aucun doute, il n'en reste pas moins que le comportement d'un prophage inducible, au cours des croisements, diffère de celui des autres déterminants génétiques de la bactérie. En effet, lorsqu'un prophage inducible tel que λ est porté par la bactérie donatrice seule, ce prophage ne se retrouve pour ainsi dire jamais dans les recombinants. Le transfert d'un tel prophage à la bactérie réceptrice a pour conséquence l'induction du développement du prophage en phage et la destruction de la bactérie réceptrice.

Quant au mécanisme de cette induction par conjugaison, deux hypothèses peuvent être considérées. Selon l'une d'elles, l'induction serait la conséquence de l'appariement entre un segment chromosomique porteur d'un prophage et un chromosome n'en portant pas. Puisque l'induction ne se produit pas lorsque c'est le chromosome de la bactérie réceptrice qui est porteur d'un prophage, il faudrait admettre que, dans les processus qui conduisent à la formation d'un recombinant, les deux segments chromosomiques homologues ne jouent pas un rôle identique. Selon une autre hypothèse, l'induction serait la conséquence de la pénétration du segment chromosomique de la bactérie donatrice, porteur d'un prophage, dans la bactérie réceptrice non immune. L'immunité d'une bactérie lysogène à l'égard d'un phage homologue surinfectant pourrait, selon cette hypothèse, avoir une expression cytoplasmique.

Les renseignements que l'induction zygotique permet d'obtenir quant au processus de conjugaison lui-même et à la formation des recombinants seront développés dans un autre mémoire [15]. Quelques points méritent d'être mentionnés dès maintenant.

L'asymétrie que l'on observe dans les croisements entre bactéries lysogènes et bactéries non lysogènes illustre d'une manière

particulièrement démonstrative le transfert, à sens unique, du matériel génétique de bactérie donatrice à bactérie réceptrice déjà établi par Hayes. L'induction zygotique constitue de ce fait une méthode d'étude très sensible de la conjugaison elle-même. Un prophage inductible, porté par la bactérie donatrice, est en effet le seul caractère génétique connu dont le transfert à la bactérie réceptrice soit immédiatement exprimé, indépendamment des processus qui conduisent à la formation de recombinants.

Dans le cas d'un prophage tel que λ , l'induction zygotique entraîne la destruction de plus de la moitié des zygotes qui peuvent être formés au cours du croisement. Elle doit donc avoir des conséquences importantes quant à la formation des recombinants. On observe, en effet, que non seulement la fréquence de recombinaison observée est plus faible que dans un croisement témoin, mais aussi que la constitution génétique des recombinants obtenus est elle-même altérée [14]. Pour que les conséquences génétiques de l'induction zygotique se manifestent, il n'est d'ailleurs pas nécessaire que le développement du prophage aboutisse à la formation de particules infectieuses. C'est le cas d'un croisement où les bactéries Hfr donatrices portent un prophage λ défectif [17]. L'induction zygotique se produit néanmoins et la destruction des zygotes sera révélée par ses effets sur la formation des recombinants.

Le transfert d'un caractère donné aux recombinants est d'autant plus affecté que ce caractère est plus lié au prophage considéré. D'autre part, les prophages inductibles sont d'autant moins induits par la conjugaison qu'ils sont situés plus loin du caractère gal_b . Tous ces faits, comme nous le verrons dans un mémoire ultérieur [15], constituent des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse du transfert partiel de matériel génétique de bactérie donatrice à bactérie réceptrice. Selon nos conceptions actuelles [24, 25], un segment plus ou moins long du chromosome de la bactérie Hfr peut être transmis à la bactérie réceptrice. Le taux d'induction zygotique d'un prophage donné, λ par exemple, est une mesure de la fréquence de transfert de ce prophage au cours de la conjugaison.

Lorsque le segment chromosomique sur lequel est situé un prophage inductible n'est pas transmis à haute fréquence, le taux d'induction zygotique devient trop faible pour être mesuré. C'est le cas des croisements $F^+(\lambda)^+ \times F^-(\lambda)^-$. C'est aussi le cas de certains croisements $Hfr(\lambda)^+ \times F^-(\lambda)^-$. On sait, en effet, que l'on peut isoler des bactéries Hfr pour les caractères les plus divers et que ces mutants Hfr semblent responsables des recombinants obtenus dans un croisement $F^+ \times F^-$ [22]. Lorsque le $Hfr(\lambda)^+$ utilisé dans un croisement avec des bactéries $F^-(\lambda)^-$ ne transmet pas à haute fréquence le segment gal_b -prophages induc-

tibles (le Hfr isolé par Cavalli [6] par exemple), on n'observe pas d'induction zygotique.

En résumé, lorsqu'à la suite d'une conjugaison entre Hfr lysogène et F⁻ non lysogène, il n'y a pas développement du prophage dans la bactérie F⁻, cela signifie, soit que le prophage n'est pas inducible, soit, si le prophage est inducible, qu'il n'a pas fait partie du matériel transféré du Hfr au F⁻.



Lysogénie et héritématernelle. — D'un point de vue plus général, l'induction zygotique constitue un phénomène remarquable puisque la lysogénie, caractère à déterminisme chromosomique, ne se comporte pas de la même manière dans les croisements réciproques.

En dépit de certaines particularités de la conjugaison bactérienne (telle que la contribution inégale des deux parents à la constitution du zygote), on peut avec Hayes, assimiler à une différenciation sexuelle, le transfert à sens unique de matériel génétique. La bactérie Hfr donatrice est comparable à un gamète mâle qui apporte uniquement son matériel génétique, alors que la bactérie F⁻ réceptrice joue le rôle d'un gamète femelle qui contribue à la formation du zygote à la fois par son matériel génétique et par son cytoplasme. Dans un croisement entre bactéries lysogènes, pour λ par exemple, et bactéries non lysogènes, le caractère lysogène n'est transmis à la descendance que lorsqu'il est porté par la bactérie réceptrice. Lorsque c'est la bactérie donatrice qui est lysogène, le caractère lysogène n'est jamais transmis à la descendance. Plus encore, si l'on ne considère que ceux des zygotes qui ont reçu le prophage λ, ces zygotes sont détruits : le croisement est stérile.

L'héritématernelle du caractère lysogène présente donc les caractères d'une héritématernelle. Grâce au fait cependant que les bactéries sont haploïdes, on peut établir que le caractère lysogène apparemment hérité par voie maternelle est bien sous la dépendance d'un déterminant chromosomique, le prophage, puisque dans un croisement Hfr(λ)⁻ × F^{-(λ)+} ce déterminant ségrège parmi les recombinants.

Il est concevable que tout virus, comme un bactériophage, puisse exister sous trois états différents : l'état provirus, l'état végétatif et l'état infectieux. Si, à la faveur d'une fécondation par exemple, la pénétration d'un provirus (*pr*) dans une cellule non immune (*pr*)⁻ induit son passage à l'état végétatif, on pourrait, comme dans le cas des bactéries lysogènes, observer une asymétrie dans les croisements réciproques. Les manifestations de cette « induction zygotique » dépendraient de l'expression phénotypique particulière de l'état provirus et de l'état végétatif.

Par exemple, si l'état provirus est le seul à avoir une expression phénotypique, dans un croisement $\sigma(pr)^+ \times \varphi(pr)^-$, le caractère $(pr)^+$ du mâle ne serait pour ainsi dire jamais transmis à la descendance (sauf transition rare de l'état végétatif à l'état provirus analogue à une lysogénisation). Si seul l'état végétatif est phénotypiquement exprimé, le passage à l'état végétatif dans le croisement $\sigma(pr)^+ \times \varphi(pr)^-$ entraînerait, soit la stérilité du croisement si l'état végétatif est létal comme dans le cas du phage, soit l'apparition de symptômes pathologiques divers.

Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de dire si un modèle de ce genre pourrait s'appliquer à certains cas connus d'hérédité maternelle. Tout d'abord parce que le prophage est le seul provirus dont la localisation chromosomique ait été établie. On sait cependant qu'un exemple classique de caractère hérité par voie maternelle, la sensibilité au gaz carbonique chez la drosophile, est lié à la présence d'un virus [26]. D'autre part, un grand nombre d'autres cas d'hérédité maternelle, attribués à des facteurs cytoplasmiques [27], ressemblent, dans leurs manifestations, à des maladies à virus. Quoique la présence d'un virus n'ait pas pu être démontrée, on sait qu'une telle démonstration est souvent malaisée, particulièrement en ce qui concerne les virus des plantes. D'ailleurs, chez des bactéries lysogènes défectives, la présence d'un provirus, quoique n'aboutissant presque jamais à la formation de particules infectieuses, donne cependant lieu dans les mêmes conditions qu'avec les bactéries lysogènes normales, au phénomène d'induction zygotique. Dans ce cas, la lysogénie, processus non infectieux, est un caractère létal potentiel qui n'est transmis à la descendance d'un croisement que par les bactéries F⁻ réceptrices.

Nous tenons à remercier M^{les} Marie-Renée Hartmann, Yannick Nicolas et Michèle Fiquet, pour l'aide qu'elles ont apportée à la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ.

1° Dans un croisement entre bactéries Hfr portant le prophage λ et bactéries F⁻ non lysogènes, le développement du prophage λ de plus de la moitié des bactéries Hfr est induit. Induction et développement du prophage ont lieu dans la bactérie F⁻ réceptrice. Ce phénomène, désigné sous le nom d'induction par conjugaison ou induction zygotique, explique les anomalies observées au cours des croisements réciproques entre bactéries lysogènes et non lysogènes.

2° Lorsque c'est la bactérie F⁻ réceptrice qui est lysogène, ou lorsque les deux bactéries donatrice et réceptrice portent l'une et

l'autre un prophage de même type, la conjugaison ne s'accompagne pas d'induction. L'induction zygotique illustre la notion de transfert à sens unique de matériel génétique au cours de la conjugaison.

3° Différents prophages inductibles par la lumière ultraviolette sont aussi inductibles par la conjugaison. Tous les prophages inductibles étudiés sont situés sur le même segment chromosomique. Pour une souche Hfr donnée, le taux d'induction par conjugaison est une propriété caractéristique de chacun des prophages inductibles et dépend de la position de ce prophage sur le chromosome bactérien.

4° Différents prophages, non inductibles par la lumière ultraviolette, ne sont jamais induits par conjugaison. Tous ces prophages sont situés sur un autre segment du chromosome que les prophages inductibles.

5° Au cours d'un croisement, le transfert d'un prophage inductible d'une bactérie donatrice lysogène à une bactérie réceptrice non lysogène est immédiatement exprimé par l'induction de son développement. Le taux d'induction zygotique d'un prophage inductible donné est donc une mesure de la fréquence de son transfert.

6° Le mécanisme de l'induction zygotique, ses conséquences génétiques et son utilisation comme modèle éventuel de certains cas d'hérédité maternelle sont discutés.

SUMMARY.

1° In a cross between Hfr bacteria lysogenic for λ and non lysogenic F-, induction of λ prophage development occurs in over half of the possible mating events. Both induction and development take place in the F- recipient cell. This phenomenon, described as « zygotic induction », explains the observed anomalies in reciprocal crosses between lysogenic and non lysogenic bacteria.

2° When the F- recipient is lysogenic, or when both the Hfr donor and the F- recipient are lysogenic for the same prophage type, zygotic induction does not occur. This is an illustration of the one-way transfer of genetic material in a cross.

3° Different prophages inducible by U.V. light are also inducible by conjugation. These inducible prophages are all located on the same chromosomal segment. With a given Hfr strain, the rate of zygotic induction is a characteristic property of each inducible prophage and is related to its location on the bacterial chromosome.

4° Different prophages non inducible by U.V. light, are never induced by conjugation. Such non inducible prophages are all

located on another segment of the bacterial chromosome than the inducible prophages.

5° The transfer of an inducible prophage from a lysogenic donor to a non lysogenic recipient is immediately expressed through induction and development of the prophage. The rate of zygotic induction of a given inductible prophage is therefore a measure of the frequency of its transfer.

6° The mechanism of zygotic induction, its genetical consequences and its usefulness as a possible model for certain aspects of maternal inheritance are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TATUM (E. L.) et LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 673.
- [2] LEDERBERG (J.), LEDERBERG (E. M.), ZINDER (N. D.) et LIVELY (E. R.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 413.
- [3] CAVALLI-SFORZA (L. L.) et JINKS (J. L.). *J. Genetics*, 1956, **54**, 87.
- [4] HAYES (W.). *Nature*, 1952, **169**, 118.
- [5] HAYES (W.). *J. gen. Microb.*, 1953, **8**, 72.
- [6] CAVALLI (L. L.). *Boll. Ist. Sieroter. Milano*, 1950, **29**, 281.
- [7] HAYES (W.). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 75.
- [8] LEDERBERG (J.). *J. cell. comp. Physiol.*, 1955, **45**, suppl. 2, 75.
- [9] LEDERBERG (E. M.). *Genetics*, 1951, **36**, 560.
- [10] LEDERBERG (E. M.) et LEDERBERG (J.). *Genetics*, 1953, **38**, 51.
- [11] WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 281.
- [12] APPLEYARD (R. K.). *Genetics*, 1954, **39**, 429.
- [13] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 317.
- [14] WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 455.
- [15] WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *Ces Annales*, 1956, en préparation.
- [16] LEDERBERG (J.) et LEDERBERG (E. M.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 399.
- [17] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 282.
- [18] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 653.
- [19] WEIGLE (J. J.) et BERTANI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 175.
- [20] LIEB (M.), WEIGLE (J. J.) et KELLENBERGER (E.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 468.
- [21] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 101.
- [22] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 303.
- [23] JACOB (F.). *Virology*, 1955, **1**, 207.
- [24] WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2449.
- [25] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2566.
- [26] L'HÉRITIER (Ph.). In *Problèmes actuels de Virologie*, 1954, Masson, édit., Paris.
- [27] CASPARI (E.). *Advances in Genetics*, 1948, **2**, 1.

ÉTUDE DE L'ACTION DES RAYONS ULTRAVIOLETS SUR LE SYSTÈME LYSOGÈNE *ESCHERICHIA COLI*

K 12 (λ), K 12 S, λ .

par H. MARCOVICH (*).

(Institut Pasteur,
Service de Radiobiologie et de Cancérologie)

Dans un travail antérieur [11] a été étudiée l'action des radiations ionisantes sur le système lysogène K 12 (λ), K 12 S, λ . De par les phénomènes d'absorption dont ils sont l'objet, les photons non ionisants agissent selon des processus très différents de ceux des radiations de grande énergie. Le fait que l'induction soit produite par les rayons ultraviolets [9] et par les rayons X [4] permet d'étudier l'action de ces deux types de rayonnements sur un certain nombre de propriétés d'un même système biologique, ayant d'étroites relations entre elles.

On se propose dans ce travail, de mener avec les rayons U.V. une étude parallèle à celle déjà effectuée avec les rayons X et d'analyser comparativement les modes d'action de ces deux rayonnements.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Ils sont les mêmes que ceux décrits dans le travail précédent [11]. La souche bactérienne est *Escherichia coli* K 12 (λ) provenant du laboratoire du Dr Lwoff. La culture en bouillon tryptone est utilisée quand elle atteint une densité de $3 \cdot 10^9$ bactéries/cm³. La souche sensible au phage λ est une souche *E. coli* K 12 S résistante à la streptomycine.

Les irradiations sont effectuées sous 2 mm d'épaisseur d'un milieu minéral tamponné [10], refroidi à 0°, dans lequel la culture est diluée 100 fois de manière à ne pas absorber par le bouillon une fraction importante et incontrôlée des rayons ultraviolets.

La source est une lampe germicide à vapeur de mercure à basse pression, dont l'émission est en majeure partie constituée par la radiation 2537 Å.

Les doses reçues à la surface de la suspension sont déterminées à l'aide d'un dosimètre à cellule au sélénium [4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mai 1956.

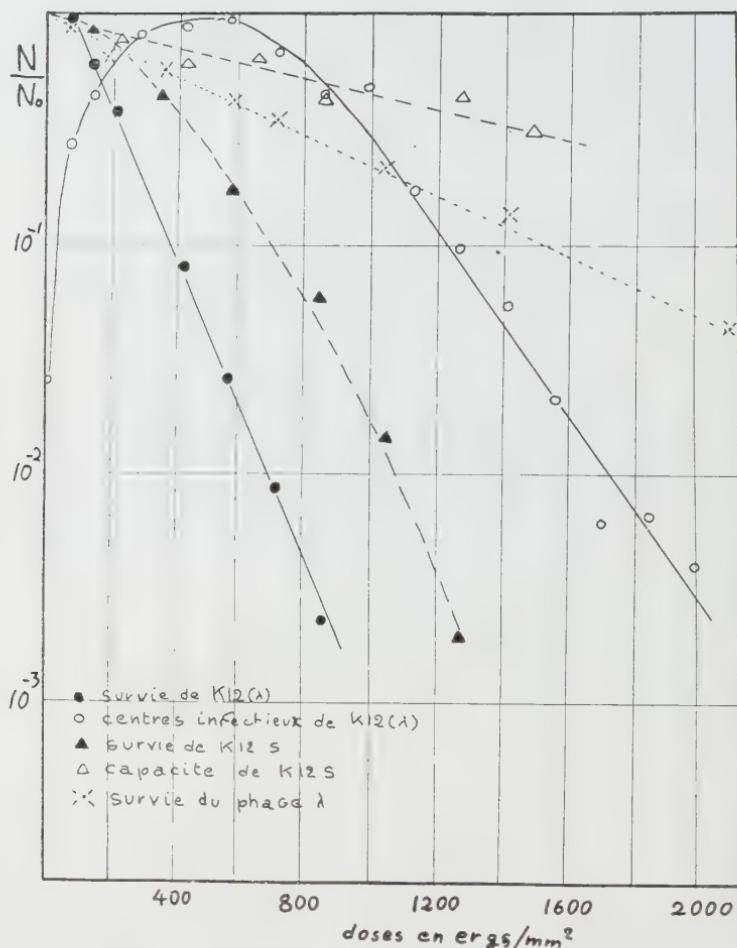


FIG. 1. — Courbes d'induction et de survie de K 12 (λ). Une culture de bactéries *E. coli* K 12 (λ) est effectuée en bouillon tryptone jusqu'à une densité de 3.10^9 bactéries/cm³. On dilue cent fois en tampon phosphate et on irradie avec des doses croissantes de rayons U.V. On détermine le nombre de bactéries survivantes ainsi que le nombre de bactéries induites à produire des phages.

On a représenté à titre comparatif les courbes de survie du phage λ , de la souche K 12 S, de la souche K 12 Sr et la courbe de la capacité de K 12 S préalablement irradié d'assurer la multiplication de bactériophages infectants.

RÉSULTATS.

1° La courbe d'induction de K 12 (λ) est semblable à celle trouvée par Weigle et Delbrück [14]. Toutefois, sa portion descendante a une pente sensiblement plus grande en valeur absolue

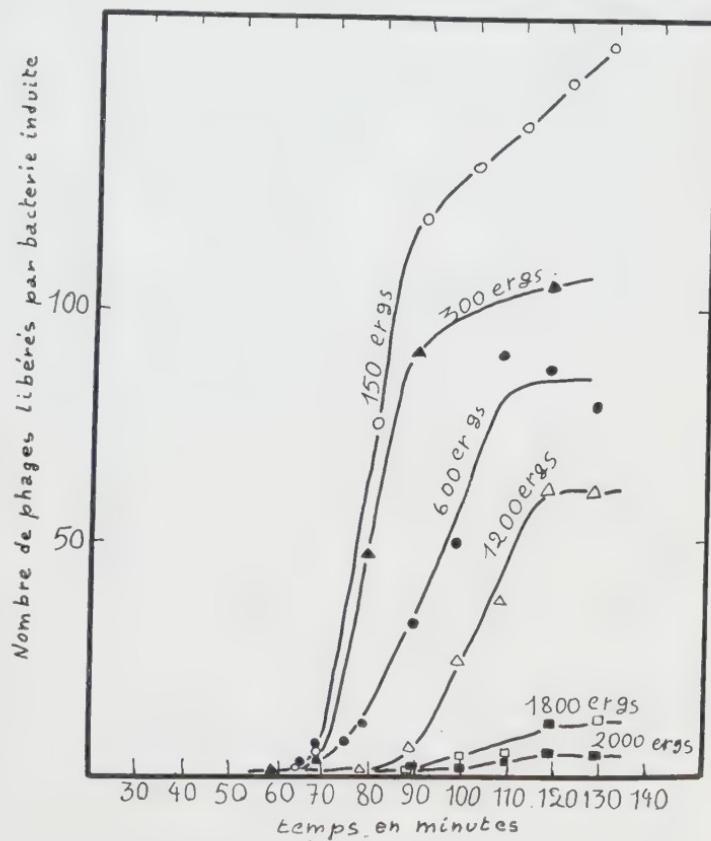


FIG. 2. — Période latente et rendement moyen en phages des bactéries *E. coli* K 12 (λ) irradiées avec des doses croissantes de rayons U. V.

que celle de la survie du bactériophage λ , contrairement aux résultats de ces auteurs (fig. 1). La survie de K 12 (λ) décroît rapidement avec la dose. En coordonnées semi-logarithmiques, la courbe représentative de cette décroissance est une droite qui s'extrapole au-dessus du point 0. La résistance de K 12 S aux rayons U.V. est beaucoup plus grande que celle de K 12 (λ) et l'allure de sa courbe de survie est nettement différente. On ne

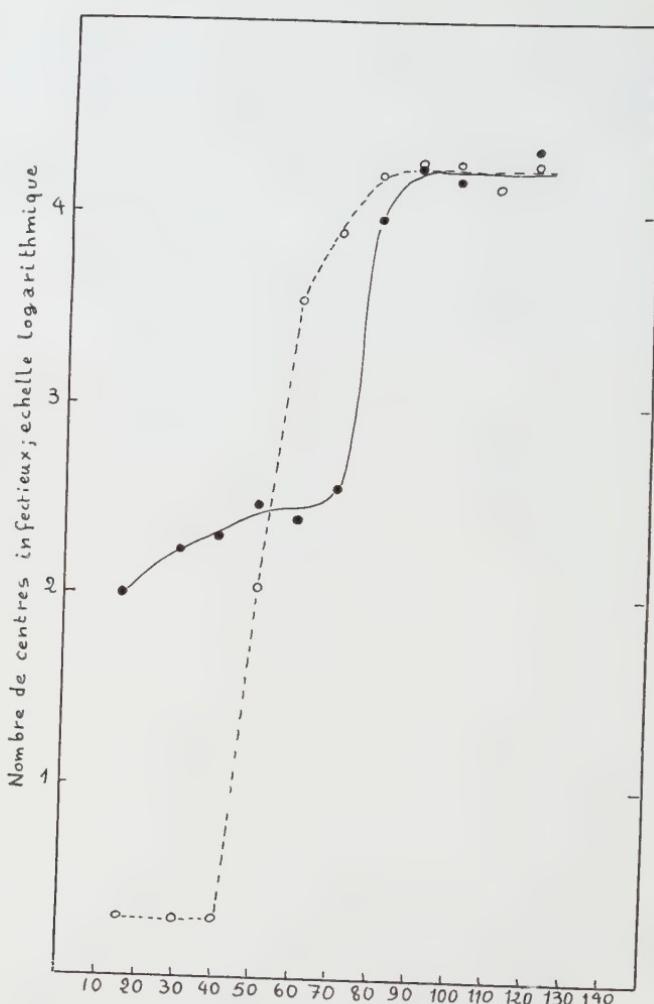


FIG. 3. — Période latente et analyse intracellulaire de l'apparition de particules infectieuses.

Des bactéries *E. coli* K 12 (λ) irradiées en tampon avec 150 ergs/mm² sont incubées en bouillon à 37°. À divers intervalles de temps on prélève un échantillon dont une fraction est étalée immédiatement en présence de la souche indicatrice (courbe en trait continu). Une autre fraction est additionnée de 2 000 µg/cm³ de streptomycine, laissée quinze minutes à la température du laboratoire puis étalée en présence de la souche indicatrice (courbe en pointillé).

peut, sur les données de la figure 1 ni sur celles de plusieurs expériences ayant donné des résultats superposables, déterminer si la différence de sensibilité entre les deux souches est due exclusivement à l'existence de l'induction chez K 12 (λ).

La capacité de K 12 S de reproduire le phage λ infectieux est plus radiorésistante que celle de K 12 (λ) de permettre la maturation des phages induits.

2° Quand on induit K 12 (λ) avec les rayons ultraviolets, la

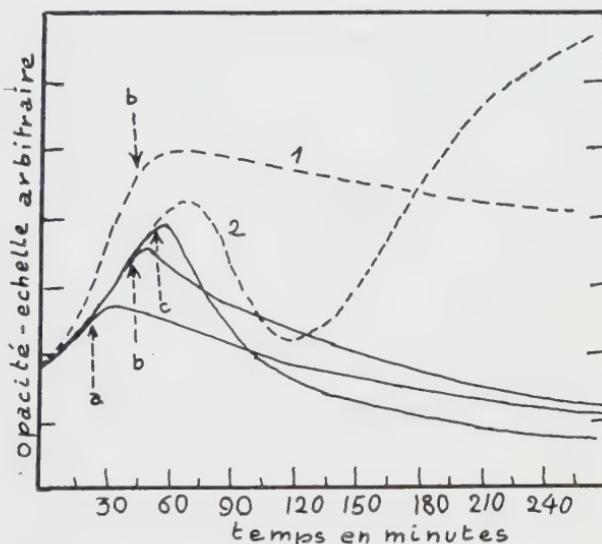


FIG. 4. — Lyse optique des bactéries *E. coli* K 12 (λ) induites avec 300 egrs/mm².

La suspension bactérienne est répartie dans les cuves du photomètre enregistreur de Bonét-Maury. On ajoute de la streptomycine (2 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) à divers intervalles de temps, a, b, c.

1. Témoin non irradié;

2. Témoin irradié, sans streptomycine.

lyse commence après une période latente d'autant plus longue que la dose est plus forte (fig. 2). Sa durée minimum, de l'ordre de 65 minutes, excède de 10 minutes celle de l'induction par les rayons X, et de 20 minutes celle de l'infection de K 12 S par λ . Un fait analogue a été décrit chez *Pseudomonas pyocyanus* [13]. Parallèlement à l'allongement de la latence, le rendement moyen des bactéries en phages diminue dans des proportions considérables [2, 14]. Il passe de 150 à une valeur de quelques unités pour des doses de l'ordre de 2 000 ergs/mm². Il convient de rapprocher ces perturbations, apportées par l'irradiation aux

réactions qui conduisent à la synthèse des phages, de celles que subit la multiplication des bactéries K 12 S survivant à une forte irradiation. En effet, dans ces conditions, le développement des colonies est considérablement ralenti.

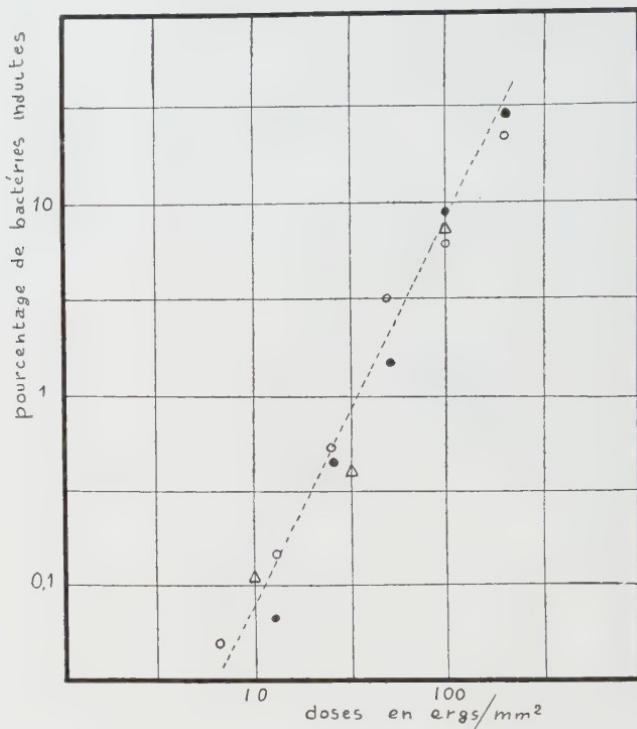


FIG. 5. — Induction de K 12 (λ) par de faibles doses de rayons U. V. Une suspension de bactéries *E. coli* K 12 (λ) est diluée cent fois en tampon phosphate. On l'irradie avec des doses croissantes de rayons U. V., on incube à 37° en bouillon pendant soixante-cinq minutes, puis on ajoute 1/20 de sérum anti- λ . On laisse agir dix minutes et on dilue cent fois dans du bouillon contenant 2 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de streptomycine. Après quinze minutes à la température du laboratoire, on titre le nombre de bactériophages libres dans le milieu.

Le pourcentage d'induction est évalué en comparant le nombre de phages ainsi obtenus avec le nombre de bactéries induites par une même dose de 200 r et étalées en présence de la souche indicatrice avant qu'elles ne se lysent.

Les premiers phages mûrs apparaissent dans les bactéries induites une vingtaine de minutes avant la fin de la période latente (fig. 3). Dans un mémoire précédent [11], il a été montré que la streptomycine détermine l'ouverture des bactéries conte-

nant des bactériophages mûrs sitôt qu'elle est ajoutée à une suspension de bactéries lysogènes non résistantes et ayant subi un choc inducteur. La figure 4 montre que la lyse optique se produit dans les minutes qui suivent l'adjonction de l'antibiotique et que cette lyse est d'autant plus accusée que l'on se trouve plus près de la fin de la période latente.

3° La relation dose-effet dans l'induction de K 12 (λ) :

Pour étudier la partie ascendante de la courbe d'induction, on a utilisé une méthode précédemment décrite [40, 42], fondée sur le titrage des bactériophages libérés par les bactéries induites. Les doses inférieures à 200 ergs n'affectent ni la période latente ni le rendement moyen en phages. Dans la figure 5, ont été représentés en fonction de la dose, les pourcentages de bactéries induites au cours de trois expériences indépendantes, dans un intervalle allant de 6 ergs/mm² à 200 ergs/mm². La courbe obtenue est une droite de pente égale à 2 dans la représentation en échelle logarithmique adoptée ici. On peut donc écrire :

$$\log \frac{N}{N_0} = 2 \log kD \quad \text{d'où } \frac{N_0}{N} = kD^2 + \text{Cte} \quad (1)$$

où $\frac{N}{N_0}$ est la fraction des bactéries induites par une dose D.

On sait que dans un processus qui dépend de la survenue d'au moins 2 fois le même événement (atteinte d'une cible unique par deux projectiles distincts), la relation qui lie le nombre de ces événements (ici c'est la dose) à l'effet observé est :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kD} \left[\frac{(kD)^2}{2!} + \frac{(kD)^3}{3!} + \dots \right] \quad (2)$$

Si kD est petit (dose faible), e^{-kD} est voisin de 1 et $(kD)^2$ est grand devant les autres termes de la série, d'où :

$$\frac{N}{N_0} \approx \frac{k^2}{2} D^2 \quad (3)$$

En coordonnées logarithmiques, la courbe représentative de la relation (3) est une droite de pente 2. On aboutit à la même conclusion si le processus envisagé dépend de la survenue de deux événements distincts (par exemple, atteinte de deux cibles distinctes par deux projectiles différents). La relation entre la dose et l'effet est dans ce cas :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-kD})^2 \quad (4)$$

Si kD est petit, cette expression s'écrit :

$$\frac{N}{N_0} \approx k^2 D^2 \quad (5)$$

On retrouve au facteur 1/2 près la même relation que précédemment. D'après la courbe expérimentale, on ne peut décider entre les deux éventualités.

LE FACTEUR TEMPS-DÉBIT.

On a modifié le débit du rayonnement au niveau de la préparation en faisant varier la distance de celle-ci à la source et en réduisant la surface émettrice par un diaphragme.

Les irradiations ont été effectuées dans de petites cuves de pyrex plongées dans la glace fondante. Dans le tableau I sont donnés les résultats observés avec une irradiation de 17,5 ergs/mm² administrée dans des temps variant entre 10⁻¹ et 10⁴ secondes.

TABLEAU I.

Temps en secondes	0,1	1	10	100	1.000	10.000
Nr.	460	511	333	433	397	340
Ns 97						

— Nombre de phages libres (Nr) comptés dans une suspension de K 12 (λ) irradiée ; et dans la suspension témoin (Ns) —.

Il est manifeste d'après ces résultats que l'action inductrice des rayons ultraviolets n'est pas significativement modifiée par une variation du débit de l'ordre de 10⁵ fois.

ACTION DE LA TEMPÉRATURE.

Il est aisé de fixer la température d'une suspension bactérienne dans un intervalle de 0° à 40°, et de l'irradier pendant un temps suffisamment court pour que les conditions physiologiques des bactéries puissent être considérées comme constantes. Dans le tableau II figurent les résultats d'irradiations effectuées à différentes températures, avec une dose de 30 ergs/mm² administrée en 30 secondes.

TABLEAU II.

Température	0	10	20	30	40°
Nr	1128	876	1171	1045	1095
Ns=54 à 15°					

— Nr nombre de bactériophages dans l'échantillon irradié.

— Ns nombre de bactériophages dans l'échantillon témoin.

A noter que des témoins exposés pendant 10 minutes à 40°, 15° et 0° montrent le même nombre de phages.

DISCUSSION.

D'après les courbes des figures 1 et 5, les phénomènes produits par l'irradiation du système lysogène utilisé apparaissent plus complexes avec les rayons ultraviolets qu'avec les rayons X [41]. Ces derniers ne donnent lieu qu'à des relations dose-effet exponentielles.

L'efficacité de l'action létale des deux rayonnements sur le phage λ peut être étudiée, puisque dans les deux cas les effets observés ressortissent de phénomènes à un événement. En revanche, pour les bactéries, la signification des relations à « coups multiples » est pour l'instant peu claire, en ce qui concerne l'action létale, puisque la mort peut résulter de lésions très diverses. L'induction fait exception. Il s'agit en effet d'une réponse à l'irradiation bien spécifique, obéissant à un processus à deux coups. C'est pourquoi il paraît légitime de tenter une comparaison quantitative entre les actions inductrices des rayons X et ultraviolets.

1^o *Inactivation du phage λ* : La dose incidente qui laisse 37 p. 100 de survivants est de 600 ergs avec les rayons ultraviolets et de 10^5 r environ avec les rayons X de 0,9 Å agissant essentiellement par effet direct.

Dans les conditions expérimentales réalisées, les rayons X à la dose de 1 r à la surface de la suspension libèrent une énergie d'un peu moins de 90 ergs/cm³ dans l'eau, ce qui donne, en tenant compte de la densité du phage, une valeur de 130 ergs/cm³.

En ce qui concerne l'absorption des rayons U.V., on peut considérer que dans le phage λ elle a lieu en majeure partie dans l'acide nucléique. Les valeurs des coefficients d'absorption de ces acides admises autrefois paraissent quelque peu élevées [6]. De récentes mesures effectuées sur le principe transformant du pneumocoque donnent comme valeur à ce coefficient $2,6 \cdot 10^4$ cm⁻¹ (Latarjet et Ephrussi-Taylor : communication personnelle). En adoptant cette valeur, on trouve que 600 ergs/mm² libèrent une énergie de $1,5 \cdot 10^9$ ergs/cm³ dans les phages irradiés.

A effet biologique égal, les rayons X sont par conséquent énergétiquement près de 115 fois plus efficaces que les U.V.

2^o *L'induction* : L'action inductrice des rayons X et U.V. ne peut se comparer comme précédemment en confrontant les énergies libérées pour la production d'une même fréquence de bactéries induites. Avec les rayons X la relation dose-effet est exponentielle [40, 42] tandis qu'elle ressortit à un processus à deux événements avec les U.V. Il faut donc comparer les doses de chacun de ces rayonnements qui produisent le même nombre d'événements. Ainsi la dose 63 p. 100 d'induits par les

rayons X serait-elle à rapprocher de la dose 26,4 p. 100 d'induits par les rayons U. V. avec lesquels en moyenne il se produit un événement par bactérie. Ce sont respectivement les doses de 15 000 r et de 300 ergs/mm².

Le raisonnement suivi est le même que celui effectué pour le phage λ .

Le spectre d'action des rayons U. V. dans l'induction de K 12 (λ) semble indiquer que le chromophore est une nucléoprotéine [4]. En adoptant le même coefficient d'absorption que pour le phage, soit $2,6 \cdot 10^4$ cm⁻¹, on trouve que 300 ergs/mm² correspondent à une énergie libérée de $7,8 \cdot 10^8$ ergs/cm³. 15 000 r fournissent de leur côté $1,95 \cdot 10^6$ ergs/cm³.

Le rapport des énergies est donc :

$$\frac{7,8 \cdot 10^8}{1,9 \cdot 10^6} = 400.$$

Les rayons X seraient par conséquent près de 400 fois plus efficaces que les U. V.

3° *Le rendement quantique : a) Phage λ* : L'évaluation de la probabilité d'action d'un quantum n'est pas aisée puisqu'elle suppose la connaissance du nombre total de photons effectivement absorbés par un phage. Zelle et Hollaender en ont fait une analyse pour les phages T1 et 2 [15]. Les valeurs trouvées sont pour ces deux virus, respectivement de $6,41 \cdot 10^{-4}$ à $6,24 \cdot 10^{-4}$ et de $3,29 \cdot 10^{-4}$ à $2,99 \cdot 10^{-4}$.

λ est beaucoup plus voisin de T2 que de T1. Cependant, il contient près de 2 fois moins de DNA que le premier par particule [8]. En adoptant pour λ le même coefficient d'absorption que pour T2 et compte tenu de la différence de teneur en DNA, on trouve un rendement quantique de $1,9 \cdot 10^{-4}$.

Pour évaluer ce rendement, on peut recourir à une autre méthode utilisée par Latarjet et Wahl [5]. Supposons que la cible offerte aux rayons X soit précisément le chromophore. Supposée sphérique, son diamètre, d'après les abaques de Lea [7], serait au moins de 30 m μ , ce qui donne un volume de $1,41 \cdot 10^{-17}$ cm³. Ceci correspond, en prenant comme coefficient d'absorption $2,6 \cdot 10^4$ cm⁻¹ et puisque 1 erg de lumière ultraviolette de 2537 Å comporte $1,277 \cdot 10^{11}$ photons, à un rendement quantique de $3,6 \cdot 10^{-4}$.

En prenant pour diamètre 20 m μ qui correspond à une cible dont on sous-estime le volume au maximum, le rendement est de $1,2 \cdot 10^{-3}$.

Les deux méthodes donnent par conséquent des résultats assez comparables ; on peut les tenir pour satisfaisants étant donné les incertitudes attachées à de tels calculs.

4° *L'induction* : Si on suppose que le diamètre de la « cible »

induction est de l'ordre de 100 m μ , on trouve en raisonnant comme pour le phage λ que le rendement quantique pour la production d'un événement est de $1,5 \cdot 10^{-4}$, c'est-à-dire qu'il y aurait un photon efficace pour 6 700 absorbés.

Les courbes de la figure 2 montrent que les bactéries induites peuvent être le siège de lésions satellites capables d'entraver la maturation d'une fraction plus ou moins importante des phages. Le nombre de ces derniers, produit par une bactérie irradiée, décroît en fonction de la dose comme si une partie des substances nécessaires à leur édification était rendue inutilisable.

Rappelons qu'avec les rayons X la période latente et le rendement en virus restent inchangés pour des doses considérables ne laissant qu'une faible fraction des bactéries capables d'assurer la maturation des phages.

Une telle différence entre l'action des rayons X et des rayons ultraviolets peut trouver son explication dans la quantité d'énergie considérablement plus grande que dissipent les derniers pour produire un même effet biologique que les autres.

RÉSUMÉ.

1° L'induction de K 12 (λ) par les rayons U. V. se fait selon un processus à deux événements ;

2° L'action inductrice n'est pas modifiée par une variation du débit de 10^5 fois ;

3° L'efficacité inductrice d'une dose donnée n'est pas influencée par la température (0° à 40°) des bactéries au moment de l'irradiation.

4° Les rayons X sont énergétiquement beaucoup plus efficaces que les U. V. dans leur action létale sur le phage λ et dans l'induction lysogénique de K 12 (λ) ;

5° Le rendement quantique pour ces deux effets est évalué.

SUMMARY.

1° Induction of phage development in K 12 (λ) with U. V. light (2537 Å) is a two events phenomenon ;

2° Induction by a certain dose is not affected by a change of 10^5 in the dose-rate ;

3° Induction with a given dose is not affected by the temperature (0° to 40°) of the bacterial suspension during irradiation ;

4° X radiation is energetically more efficient than U. V. in killing phage λ and for induction ;

5° The quantum-yield is estimated in both cases.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRANKLIN (R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **43**, 137.
- [2] JACOB (F.). *Thèse Fac. Sci. Paris*, 1954.
- [3] LATARJET (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 389.
- [4] LATARJET (R.), MORENNE (P.) et BERGER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 174.
- [5] LATARJET (R.) et WAHL (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **74**, 336.
- [6] LAVIN (G. I.), THOMPSON (R. H. S.) et DUBOS (R.). *J. biol. Chem.*, 1938, **125**, 75.
- [7] LEA (D. E.). *Action of radiations on living cell*. Cambridge, University Press, édit., 1955.
- [8] LWOFF (A.). *Bact. Rev.*, 1953, **17**, 270.
- [9] LWOFF (A.), SIMNOVITCH (L.) et KJELDGAARD (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 815-859.
- [10] MARCOVICH (H.). *Nature*, 1954, **174**, 796.
- [11] MARCOVICH (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **90**, 303.
- [12] MARCOVICH (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **90**, 458.
- [13] TOBIN (J. O.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 635.
- [14] WEIGLE (J.) et DELBRUCK (M.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [15] ZELLE (M. R.) et HOLLOWENDER (A.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 210.

QUELQUES ASPECTS DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC EN CULTURE DE TISSUS.

par L. HIRTH et G. SEGRETAIN (*).

(*Institut Pasteur,
Service de Physiologie Végétale et Mycologie*)

INTRODUCTION.

L'étude de la multiplication du virus de la mosaïque du tabac et de ses relations avec le métabolisme de l'hôte a été abordée par de nombreux auteurs utilisant des plantes entières : Spencer [1, 2, 3], Bawden et Kassanis [4], Helms et Pound [5]. La complexité des facteurs divers intervenant dans les phénomènes observés sur des plantes entières est telle, que de nombreux auteurs ont tenté de mettre au point des techniques relativement simples, permettant d'étudier la multiplication du virus sur des fragments d'organes isolés : B. Commoner, F. L. Mercer, P. Merrill et A. J. Zimmer [6].

La technique des cultures de tissus mise au point par Gautheret [7] et White [8] a permis à l'un de nous [9] et à Morel [10] de montrer que les virus végétaux peuvent se multiplier dans des tissus normaux ou pathologiques (crown-gall) de tabac cultivés *in vitro*. Cette technique s'est rapidement révélée utilisable pour l'étude des problèmes posés par la multiplication des virus végétaux. Elle a été utilisée par l'un d'entre nous [11] pour étudier l'action du lait de coco à la fois sur la croissance des tissus et sur la multiplication du virus. Il nous a paru intéressant de préciser le mode d'action du lait de coco, en étudiant l'action sur la multiplication du virus de substances azotées dont la plupart entrent à la fois dans la constitution du virus de la mosaïque du tabac et dans celle du lait de coco. D'autre part, le lait de coco ayant une action importante sur la croissance des cals, la technique des cultures de tissus peut permettre d'examiner les rapports existant entre la multiplication des cellules et celle du virus de la mosaïque du tabac.

a) *Culture de tissus.* — Les cals utilisés sont des fragments de tumeurs de tabac (crown-gall). La tumeur initiale est obtenue par inoculation d'*A. tumefaciens* à *Nicotiana tabacum* (variété P19)

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mai 1956.

de Bergerac); cette tumeur est débitée en fragments et chacun d'entre eux est greffé sur des tabacs qui ont été préalablement inoculés avec une souche de virus de la mosaïque du tabac; en deux à trois mois des tumeurs volumineuses se développent et sont à peu près dépourvues d'*A. tumefaciens*; il est alors facile de les mettre en culture en utilisant la technique classique. Les fragments ainsi mis en culture se développent rapidement sur Knop gélosé dilué de moitié, additionné de saccharose et d'acide naphthalène acétique à la concentration moyenne de 5×10^{-7} . L'emploi de cals provenant de crown-gall de tabac se justifie par l'impossibilité d'obtenir le développement dans des conditions satisfaisantes de cultures normales de tabac sain (Morel a pu cependant obtenir des tissus de tabac sain accoutumé aux hétéro-auxines). Les cals de tabac sain ne se développent qu'en présence de concentrations relativement élevées de lait de coco; les mélanges d'acides aminés préconisés par Paris et Duhamet [12] et destinés à remplacer le lait de coco se sont montrés incapables d'assurer la croissance de tissus normaux de tabac.

Dans ces conditions on a pu isoler et entretenir pendant cinq ans une souche de crown-gall du tabac dont le pouvoir de prolifération n'a pas subi de modifications.

D'autre part, au cours des titrages de virus qui ont été effectués sur les cals de la souche isolée et conservée aux fins de repiquage, aucune modification sensible du taux de virus présent dans les cals n'a été constatée. On peut donc admettre que la régularité de la multiplication du virus n'est pas affectée par les repiquages successifs des cals sur milieux neufs (tableau I).

TABLEAU I (1^{re} partie). — Titrage sur *N. glutinosa*.

Dates	Nombre de lésions (moyenne de 6 feuilles)
25 - 10 - 52	39
6 - 3 - 53	48
22 - 3 - 54	29
7 - 6 - 54	72

TABLEAU I (2^e partie). — Titrage des solutions au moyen du Beckman.

Dates	Divisions du Beckman (par gramme de substance fraîche)
6-6 - 54	0,300
8 - 10 - 54	0,416

b) *Dosage du virus.* — Les cals, après une moyenne d'environ soixante jours de croissance, sont pesés et broyés au mortier en présence de tampon phosphate 0,01 M à pH 7. Deux techniques ont été employées.

1° Les cals sont broyés en présence d'un volume de tampon proportionnel au poids du cal ; après une centrifugation de trente minutes à 6 000 t/m, on fait directement les titrages sur *N. glutinosa* ;

2° Les cals sont broyés en présence de 10 cm³ de tampon phosphate ; les extraits sont alors mis au bain-marie pendant quinze minutes à 60°, puis centrifugés pendant trente minutes à 6 000 t/m ; le virus peut alors être extrait par voie chimique (précipitation par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation) ou par centrifugation à 35 000 t/m pendant cinquante minutes (Spinco type L). Dans ce dernier cas on alterne deux centrifugations à 35 000 t/m et à 6 000 t/m. Le virus sédimenté est additionné de 5 cm³ de tampon phosphate pH 7 à 0,01 M et laissé pendant douze heures à la température du laboratoire. On mesure la densité optique des solutions dans l'U.V. à 2 650 Å ; on ramène alors à la quantité de virus présente par gramme de substance fraîche. Les résultats obtenus sont vérifiés par titrage sur *N. glutinosa* et par la recherche de la dilution maxima des solutions de virus à laquelle un sérum antivirus de lapin précipite encore. Les diverses techniques énumérées ont été employées alternativement ou conjointement au cours de 9 séries de titrages qui ont été effectués au cours des années 1953, 1954 et 1955.

RÉSULTATS.

1° ESSAIS PRÉLIMINAIRES DE L'INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC.

— Dans une série d'essais préliminaires, des fragments de cals de crown-gall de tabac provenant de la souche isolée dans les conditions indiquées plus haut, ont été cultivées sur des milieux à base de Knop dilué de moitié et contenant 30 g de saccharose et X gouttes de solution de Berthelot par litre de milieu, de la thiamine à la concentration de $1,5 \times 10^{-6}$ et de l'acide naphtalène acétique à 5×10^{-7} . L'un des acides suivants a été ajouté à 215 cm³ de milieu base à raison de 200 mg pour les acides racémiques et de 100 mg pour les formes optiquement actives :

Acide DL-aspartique, isoleucine, phénylalanine, DL-proline, DL-sérine, DL-thréonine, tyrosine, DL-valine, D-arginine et L-tryptophane.

La croissance a été faible pour les milieux contenant de l'arginine et de la proline, à peu près nulle pour ceux contenant les

autres acides aminés. Les cals ont bruni et le milieu a pu dans certains cas devenir brun lui aussi. Aux concentrations employées, les acides aminés se sont montrés défavorables à la croissance du tissu de crown-gall de tabac. Ceci est d'ailleurs en accord avec les résultats de Riker et Gutsche [13]. Cependant, les cals qui avaient été ensemencés le 18 juillet 1952 ont été broyés au mortier le 25 octobre 1952, en présence de cinq fois leur poids d'eau distillée ; les extraits ont été centrifugés à 6 000 t/m pendant trente minutes et les jus obtenus inoculés à *N. glutinosa* en utilisant la technique du carré Latin.

TABLEAU II.

Acides aminés ajoutés au milieu de base	Nombre de lésions par $\frac{1}{2}$ feuille sur <i>N. glutinosa</i> , moyenne pour 5 feuilles inoculées	
	Traité	Témoin
dl-Alanine	77	51
Isoleucine	103	28
Phenyl alanine	86	32
Proline	86	40
Sérine	92	30
dl-thréonine	62	58
Tryptophane	84	45
Tyrosine	68	44
dl-Valine	108	32

Du tableau II, il résulte que lalanine et la thréonine sont peu favorables à la multiplication du virus, que la proline, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont assez favorables. Quant à l'isoleucine, la sérine et la valine, elles semblent nettement favoriser la multiplication du virus. Cependant, les conditions de croissance des cals témoins et des cals traités étant profondément différentes, il est difficile de tirer de ces premiers essais une conclusion d'ensemble sur l'action des acides aminés. Il est possible, en effet, que les acides aminés aient agi uniquement sur la croissance des tissus qu'ils ont à peu près complètement inhibée, et non pas directement sur la multiplication du virus. Aussi ce travail a-t-il été repris en utilisant des concentrations en acides aminés plus faibles.

Les mises en culture ont été effectuées en repiquant les cals utilisables de la précédente série sur les milieux leur correspondant qualitativement dans la nouvelle série. Ainsi les cals ayant poussé sur le tryptophane sont repiqués sur les nouveaux milieux au tryptophane et ainsi de suite. Les cals ensemencés le 11 décembre 1952 ont été utilisés le 6 mars 1953.

Le tableau III résume les résultats obtenus.

TABLEAU III (*).

Acides aminés ajoutés au milieu de base	Poids moyen de 5 cals après 3 mois de culture	Aspect des cultures	Nombre de lésions sur <i>N. glutinosa</i> par $\frac{1}{2}$ feuille Moyenne de 6 $\frac{1}{2}$ feuilles traité/témoin
<u>Acide L-glutamique</u> 5 g par litre	0,550 g	Culture mammelonnée, blanche, peu de bourgeon, tendance à la nécrose.	36/46
0,147 g par litre	0,670 g	Pas de bourgeon, nécrose légère au niveau du milieu.	80/57
0,033 g par litre	1,400 g	Quelques bourgeons blancs, peu de nécrose	26/47
Témoins	1,260 g	idem	
<u>Acide aspartique</u> 0,033 g par litre	2 g	Pas de nécrose, quelques bourgeons blancs.	49/86 75/129
0,153 g par litre	1,450 g	Pas de bourgeon, quelques nécroses.	188/115 110/125
4,5 g par litre	1 g	Nécrose presque totale sur la surface du fragment.	non utilisable
Témoins	2,220 g	Pas de nécrose	
<u>Phényl alanine</u> 0,04 g par litre	1,700 g	Quelques bourgeons, partie aérienne un peu brunâtre.	24/40 et 12/18
<u>Tyrosine</u> 0,01 g par litre	1,210	Pas de brunissement pseudothalles abondants.	39/51 et 42/43
<u>Proline</u> 0,01 g par litre	1,325 g	Pas de bourgeons, surface brun clair, pas de pseudothalle.	16/18 et 26/40
<u>Histidine</u> 0,01 g par litre	1,810	Peu de brunissement, surface en grande partie couverte de pseudothalles.	28/40 et 50/37
<u>Tryptophane</u> 0,025 g par litre	2,160 g	Sans nécrose, sans bourgeon, brun clair, friable.	44/53 et 67/70
0,05 g par litre	1,400 g	Fragment compact, blanc sans nécrose ni bourgeon.	96/81 et 62/81
0,1 g par litre	1,300 g	Fragment brun, pas de bourgeon, pas de nécrose.	49/44 et 57/40
Témoins	2,200 g	Comme précédemment.	

(*) Dernière colonne (nombre de lésions sur *N. glutinosa*), 3^e ligne, au lieu de 26/47, lire 126/47.

De ces essais, il résulte que l'acide glutamique aux concentrations les plus fortes employées est défavorable à la croissance des cals et n'a pas d'influence nettement décelable sur la multiplication du virus ; par contre, à la concentration de 0,033 g/l, il exerce une influence très nettement favorable à la multiplication du virus sans avoir d'action sensible sur la croissance des cals.

L'acide aspartique exerce une action également défavorable sur la croissance des cals aux concentrations les plus fortes employées ; la concentration la plus faible, si elle est sans action significative sur la croissance, est par contre défavorable à la multiplication du virus. Les autres acides aminés essayés n'ont donné aucune différence significative par rapport au témoin.

Les résultats obtenus avec l'acide glutamique ont été confirmés par la méthode sérologique classique de précipitation au point de dilution maxima des solutions virosées (tableau IV).

TABLEAU IV. — Précipitation des jus de cals par sérum antivirus.

Acide aminé ajouté au milieu le base	Sérum anti, dilué au 1/10				
	Dilutions du jus de cals virosés				
	1/40	1/50	1/60	1/100	1/200
<u>Acide L glutamique</u>					
5 g par litre	+	+	-	-	-
0,147 g par litre	+	+	-	-	-
0,033 g par litre	+	+	+	+	+
Témoins	+	+	+	-	-

2° INFLUENCE DE CERTAINES BASES PYRIMIDIQUES SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC. — L'uracile est un des constituants de la fraction ribonucléique du virus. Il a été essayé ainsi que la thymine (base pyrimidique voisine) sur culture de tissus dans des conditions identiques à celles précédemment décrites pour les acides aminés : aux concentrations de 0,01 g/l, 0,1 g/l et 1 g/l. Le benzothiouracile et le propylthiouracile ont été également essayés. Le benzothiouracile, peu soluble, a été ajouté aux milieux de culture en solution alcoolique.

Les résultats sont consignés dans le tableau V :

Les chiffres du tableau V montrent que l'uracile exerce une action légèrement favorable à la multiplication du virus et la thymine une action défavorable. Cependant, l'étude statistique des résultats n'a pas permis d'obtenir des différences significatives entre les traités et les témoins.

Dans l'ensemble et pour tous les essais, les cals obtenus possédaient peu de bourgeons et ceux-ci étaient toujours incolores ;

quand certains cals présentaient des bourgeons à chlorophylle, ils ont été éliminés, car la présence de chlorophylle augmentait sensiblement la quantité de virus présente dans les cals et faussait les résultats.

TABLEAU V.

Bases ajoutées aux milieux	Poids des cals Moyenne de 5 cals	Aspect des cultures	Nombre de lésions par % feuille traité/témoin
<u>Thymine</u>			
0,01 g par litre 0,1 g par litre 1 g par litre	2,500 g 1,850 g 2,050 g	{ Cultures mammelonnées (couvertes de pseudo-thalles, partie centrale brune au contact du milieu; pas de bourgeon d°}	90/100 107/136 111/137
Témoin	2,250 g		
<u>Uracile</u>			
0,01 g par litre 0,1 g par litre 1 g par litre	1,500 g 1,550 g 1,150 g	{ Culture assez lisse, (couverte de pseudo-thalles. idem, mais nécroses, brunissement de la culture.	210/174 292/270
Témoin	2,150 g	Culture lisse sans bourgeon ni nécrose	160/121
<u>Propylthiouracile</u>			
0,0075g par litre 0,0175g par litre 0,075 g par litre	entièrement nécrosé 1,750 g 1,600 g	{ Surface peu mammelonnée, sans bourgeon, (sans chlorophylle. d°}	142/131 161/159
Témoin	1,600 g		
<u>Benzothiouracile</u>			
0,0075g par litre 0,0175g par litre 0,075 g par litre	1,450 g nécrosé nécrosé 1,600 g	{ Surface peu mammelonnée, sans bourgeon, (sans chlorophylle. d°}	48/46
Témoin			

De ce qui précède il résulte que les substances azotées employées peuvent avoir à la fois une influence sur la multiplication du virus et sur la croissance des cals. Deux phénomènes se superposent dont il peut être intéressant de comprendre les liens qui les unissent. Le lait de coco exaltant considérablement le pouvoir de prolifération des cals, il a paru intéressant de reprendre, en le comparant à l'action des acides glutamique et aspartique, le travail effectué par l'un d'entre nous [9] sur l'action du lait de coco sur la multiplication du virus en culture de tissus.

3° ACTION DU LAIT DE COCO ET DES ACIDES GLUTAMIQUE ET ASPARTIQUE SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC.
— De nouveaux essais ont été entrepris en cultivant des fragments de crow-gall de tabac sur trois sortes de milieux contenant

les uns 5 p. 100 de lait de coco, les autres des concentrations de 0,036 g/l et 0,021 g/l d'acide L-glutamique et d'acide DL-aspartique ajoutés au milieu de base. Les fragments ensemencés sur milieu au lait de coco, provenaient de la souche initiale entretenue sur milieu de base normal, ceux ensemencés sur acides aspartique et glutamique provenaient de fragments ayant poussé depuis trois repiquages sur des milieux analogues.

Parallèlement, et pour vérifier l'action directe des milieux étudiés sur le virus de la mosaïque du tabac, 4 cm³ de chacun des milieux étudiés ont été ajoutés à 16 cm³ d'une solution de virus purifié de la mosaïque du tabac ; l'ensemble a été laissé en contact pendant deux heures, puis les jus traités ont été inoculés par demi-feuille à des feuilles de *Nicotiana glutinosa*, la partie opposée de chaque feuille étant inoculée avec le témoin. Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pratiquement aucune action directe des milieux utilisés sur le virus de la mosaïque du tabac.

Après deux mois de culture, des lots comportant 5 cals chacun ont été constitués, pesés et broyés au mortier en présence de 10 cm³ de tampon phosphate à pH 7, 0,01 M.

Deux parties aliquotes de chacun des jus obtenus ont été prélevées et le virus a été extrait de l'une par centrifugations alternées à haute et à basse vitesse, de l'autre par précipitations par le sulfate d'ammonium. Le virus extrait est remis en suspension soit dans un volume de tampon phosphate égal à 5 cm³ par gramme de poids frais de cal, soit dans un volume constant de tampon (5 cm³). Dans ce dernier cas on ramène la quantité de virus trouvée au gramme de matière vivante fraîche. Les deux méthodes de purification du virus ont donné des résultats identiques dans tous les cas où elles ont été utilisées.

La teneur en virus a été évaluée à la fois par spectrophotométrie, par la technique sérologique classique et par titrage sur *Nicotiana glutinosa*.

Le tableau VI indique les résultats des mesures faites sur des cals ayant poussé pendant soixante-deux jours. Le tableau VII rapporte les résultats de mesures effectuées sur des cals provenant de la même série d'expériences que ceux du tableau VI, mais laissés en culture un mois de plus (quatre-vingt-onze jours de culture). La comparaison de ces tableaux appelle les remarques suivantes :

a) La croissance des cals cultivés sur lait de coco est considérablement activée par rapport aux témoins, elle atteint 154 p. 100 pendant les deux premiers mois de culture et, alors que le taux de croissance des témoins baisse sensiblement pendant le troisième mois, celui du cal mis en présence de lait de coco se maintient à un taux très élevé.

Les cals poussant sur milieux aux acides glutamique et aspartique ont un taux de croissance moins élevé que celui des témoins pendant la première phase du développement : l'acide aspartique à la concentration la plus forte employée exerce une action particulièrement nette. Pendant le troisième mois du développement,

TABLEAU VI. — Titrage du virus après deux mois de culture.

Substances ajoutées au milieu de base	Poids moyen des cals : moyenne de 5	Divisions du Beckman (virus par g, de poids frais)	Titrage sur <i>N. glutinosa</i> Nombre de lésions par $\frac{1}{2}$ feuille traité/témoin	Titrage par sérum anti				
				Dilutions de jus virosés				
				1/10	1/35	1/50	1/100	1/300
5% de lait de coco	2,630 g	0,210	197/185	+	+	+	+	-
Acide glutamique 0,036 g par litre 0,021 g par litre	1,460 g 1,700 g	0,197 0,250	179/211 187/164	+	+	+	+	+
Acide aspartique 0,036 g par litre 0,021 g par litre	1,140 g 1,700 g	0,116 0,187	226/332 167/178	+	+	+	-	-
Témoin	1,950 g	0,200		+	+	+	+	-

TABLEAU VII. — Titrage du virus après trois mois de culture.

Substances ajoutées au milieu de base	Poids des cals, (Moyenne de 6 cals)	Divisions du Beckman (par g de substance fraîche)
5% de lait de coco	3,150 g	0,520
Acide glutamique 0,036 g par litre 0,021 g par litre	1,950 g 2,200 g	0,800 0,760
Acide aspartique 0,036 g par litre 0,021 g par litre	1,800 g 2,050 g	0,480 0,440
Témoin	2,100 g	0,700

les cals déposés sur les milieux contenant les acides aminés se développent assez activement alors que le taux de croissance des témoins reste faible. Au bout de quatre-vingt-onze jours de culture, les poids des cals traités est pratiquement identique à celui des témoins. Les acides aminés exercent donc une action légèrement inhibitrice sur la croissance des cals, dont le dévelop-

nement complet est cependant atteint, mais après trois mois de culture.

En résumé, il existe un déphasage entre la croissance des témoins et celle des cals poussant sur milieux aux acides glutamique et aspartique.

b) La teneur en virus a été évaluée par gramme de substance fraîche. Dans le tableau VI l'évaluation du virus a été faite par les trois techniques décrites précédemment ; les résultats se recoupent rigoureusement : l'évaluation au moyen du Beckman permet une expression plus précise de la quantité de virus présente dans ces extraits : c'est ce mode d'évaluation qui a été surtout employé par la suite.

Au cours des deux premiers mois de culture, seul l'acide aspartique donne une inhibition nette de la multiplication du virus, surtout à la concentration la plus forte. Une légère exaltation du pouvoir de multiplication du virus est constatée en présence de concentrations faibles d'acide glutamique. Le lait de coco semble sans action.

Par contre, au bout de quatre-vingt-onze jours de culture, la quantité de virus présente par gramme de substance fraîche dans les cals ayant poussé sur lait de coco est moins forte que dans les témoins : le lait de coco semble donc inhiber la multiplication du virus tout en favorisant la croissance des cals. L'acide glutamique confirme son action favorable à la multiplication du virus sans que, au bout de quatre-vingt-onze jours de culture, des différences puissent être enregistrées entre les poids des cals traités et les poids des cals témoins. Quant à l'acide aspartique il exerce une action inhibitrice des plus nette ; seul à la concentration de 0,036 g/l il exerce une légère action inhibitrice sur la croissance.

Dans l'ensemble, l'aspect extérieur des cultures était identique pour tous les milieux utilisés ; les cals étaient durs, légèrement mamelonnés, couverts de pseudothalles et ne présentaient pas ou peu de bourgeons, en tous cas ils étaient toujours dépourvus de chlorophylle bien que les cultures aient été exposées normalement à la lumière diffuse.

c) Le tableau VIII montre les rapports qui existent entre l'accroissement de poids des cals et la multiplication du virus. On voit que, lorsque le taux de multiplication des cellules est intense, la quantité de virus présente dans les cals est, par gramme de substance fraîche, très nettement plus faible que lorsque le taux de croissance diminue : c'est au cours des trente derniers jours de culture et alors que la prolifération cellulaire a diminué d'intensité que le virus se multiplie activement. Ce phénomène, s'il se produit dans ce cas sur tous les cals étudiés, est particulièrement net pour le témoin dont le taux de croissance

a beaucoup diminué dans les trente derniers jours et où l'augmentation de la teneur en virus est considérable.

C'est dans la période où le virus se multiplie que les diverses substances ajoutées au milieu de culture exercent alors leur action, l'acide aspartique exerçant une action nettement inhibitrice, l'acide glutamique exerçant une action favorable plus discrète quoique très nette. Quant au lait de coco, son action s'exerce surtout sur la multiplication des cellules.

TABLEAU VIII. — Accroissement de poids des cals et multiplication du virus.

Substances ajoutées au milieu de bas	Accroissement moyen du poids frais au cours des 2 premiers mois de culture	Divisions du Beckman (virus par g de substance fraîche)	Accroissement moyen du poids frais au cours du 3ème mois de culture	Divisions du Beckman (virus par g de substance fraîche)
Lait de coco 5%	2,5 g	0,210	0,620 g	0,520
Acide glutamique à 0,021 g	1,4 g	0,197	0,500 g	0,760
Acide aspartique à 0,021	1 g	0,116	0,350 g	0,440
Témoins	1,450 g	0,200	0,150 g	0,700

DISCUSSION.

1° Les résultats exposés appellent les remarques suivantes : Morel [40] a montré que les cultures de tissus de crown-gall de tabac contenaient quarante à cinquante fois moins de virus que les plantes entières. Nous avons retrouvé des résultats analogues, en utilisant non pas des plantes entières, mais des disques de feuilles de tabac déposés dans un Knop dilué de moitié sans sucre et exposés à la lumière. Dans ces conditions, les disques isolés contiennent, au bout de dix-huit jours de culture, vingt-cinq fois plus de virus par gramme de substance fraîche que les cals ayant poussé pendant deux mois et dix fois plus seulement que les cals ayant poussé pendant trois mois. Les différences trouvées sont moins importantes que celles évaluées par Morel, mais les conditions expérimentales étaient autres. Ces différences tiennent sans doute à la nature des tissus comparés, mais aussi à la manière dont le virus se multiplie dans chacun des tissus étudiés. Dans un travail qui sera publié par ailleurs, nous avons pu confirmer le fait que la multiplication du virus de la mosaïque du tabac eu disque de feuille isolé se fait suivant une courbe exponentielle dont le plateau est atteint au bout de deux cents heures de culture. Dans ce cas le virus se multiplie à l'intérieur des cellules où il

a été inoculé, mais il se répand aussi à l'intérieur de cellules intactes qui ne sont pratiquement pas en voie de multiplication. Les substances ajoutées au milieu de culture agiront alors au cours de la phase exponentielle de la multiplication du virus. Dans les conditions expérimentales décrites, le virus est déjà présent à l'intérieur des cellules, il n'y aura pas d'invasion des cellules existantes comme dans le cas des feuilles isolées, mais introduction et prolifération du virus à l'intérieur de cellules nouvelles provenant de cellules en voie de multiplication intense. A proprement parler, la phase exponentielle de la multiplication du virus n'existe pas et les substances ajoutées au milieu de culture agiront dans des conditions très sensiblement différentes de celles où elles agissent sur les fragments de feuille isolés.

2° La multiplication du virus en culture de tissus est surtout active au cours du troisième mois. Or, le taux de croissance des cals a beaucoup diminué au cours de ce troisième mois. Il semble donc exister un antagonisme entre le pouvoir de multiplication des cellules et celui du virus. Ce fait n'est pas étonnant en soi ; en effet, les cals de crown-gall ne sont pas homogènes ni anatomiquement ni physiologiquement, ils comportent des régions de type méristématique possédant un grand pouvoir de prolifération et des régions plus stables où les cellules ne se multiplient guère. Il est possible que la répartition du virus dans ces diverses zones soit différente, et si on se réfère aux résultats de Limasset [14] et Morel [15], les régions proliférantes doivent être pauvres en virus et les régions moins dynamiques plus riches. En fin de culture, les cellules des cals ont un état physiologique plus proche de celui des fragments de feuille isolés qu'au début ; le virus a tendance à y adopter un mode de multiplication voisin.

En somme, la modalité de multiplication du virus à l'intérieur des cals n'est probablement pas la même au cours des différentes phases de la croissance ; elle n'est sans doute pas non plus la même dans les diverses régions du cal.

3° L'acide aspartique exerce une légère inhibition de la croissance des cals et une forte inhibition de la multiplication du virus ; il exerce donc vraisemblablement son action électivement sur la multiplication du virus. Il est intéressant de rapprocher cette action de l'acide aspartique du fait qu'il est le seul acide aminé pouvant servir de source d'azote aux tumeurs à virus isolées par Black [16] et étudiées par Nickell [17] en culture de tissus.

L'action favorisante de l'acide glutamique semble s'exercer aussi directement au niveau de la multiplication du virus. Il n'est guère possible d'interpréter avec certitude, dans l'état actuel de la question, les modalités d'action de ces deux substances dont

on remarque cependant qu'elles sont des maillons essentiels dans la chaîne du métabolisme cellulaire.

Le lait de coco a une action plus complexe. Il agit en effet à la fois sur la croissance des cals et sur la multiplication du virus et ces actions s'exercent en sens inverse. Ce fait peut être interprété de deux façons :

a) Soit que le lait de coco possède deux propriétés indépendantes, l'une activant la multiplication des cellules, l'autre exerçant un pouvoir inhibiteur sélectif sur la multiplication du virus (il faut rappeler à ce sujet qu'*in vitro* le lait de coco n'exerce aucune action décelable sur le virus).

b) Soit qu'il y ait antagonisme entre la multiplication du virus et celle des cellules, tel que toute exagération du pouvoir de prolifération des cellules se traduirait par une diminution corrélative du taux de multiplication du virus : cette dernière interprétation semble être la plus vraisemblable. En effet, les résultats obtenus montrent que la multiplication du virus est surtout active dans les cals à partir du moment où la multiplication des cellules cesse d'être intense, c'est-à-dire au cours du troisième mois de culture. Ceci permet de comprendre pourquoi, dans les fragments isolés de feuille, où la multiplication des cellules n'existe pas, la quantité de virus est proportionnellement beaucoup plus grande que dans les cals (ces résultats restent valables si les disques de feuille ont été cultivés à l'obscurité, c'est-à-dire en l'absence de toute influence du facteur photosynthétique). Il est également logique que les méristèmes contiennent moins de virus que les tissus peu ou pas proliférants (Limasset [14]). Il n'est pas possible de préciser encore de quelle nature est cet antagonisme.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par l'un d'entre nous [41] : en effet, Segretain avait montré qu'après deux mois de culture en présence de lait de coco et d'acide naphtalène acétique les cals ne contenaient pas plus de virus que ceux des témoins. Il notait que le lait de coco seul favorisait la multiplication du virus, mais les cals traités avaient un aspect morphologique différent de celui des témoins (présence de tiges feuillées) : au contraire, dans les expériences décrites plus haut, les cals, poussés sur lait de coco et acide naphtalène acétique, avaient des aspects très peu différents de ceux des témoins : la souche s'était stabilisée et ne présentait plus ni bourgeons ni tige feuillée.

RÉSUMÉ.

1^o L'action de diverses substances azotées (acides aminés et bases puriques) sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac est étudiée en culture de tissus. Seuls les acides aspartique

et glutamique exercent une action, le premier inhibant, le second favorisant la multiplication du virus.

2^o L'action du lait de coco a été étudiée et a permis de mettre en évidence l'antagonisme existant entre la multiplication du virus et celle des cellules.

Les résultats sont discutés.

SUMMARY.

1^o The action of different nitrogen compounds (amino acids and purine bases) on the multiplication of tobacco mosaic virus is studied in tissue culture. Aspartic acid and glutamic acid only are active : the former inhibits, the latter promotes the multiplication of the virus.

2^o The action of coco-nut-milk has been studied and it has been possible to demonstrate an antagonism between the multiplication of the virus and that of the cells.

The results are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SPENCER (E. L.). *Plant Phys.*, 1937, **12**, 825.
- [2] SPENCER (E. L.). *Plant Phys.*, 1939, **14**, 769.
- [3] SPENCER (E. L.). *Plant Phys.*, 1941, **16**, 663.
- [4] BAWDEN (F. C.) et KASSANIS (B.). *Ann. app. Biol.*, 1947, **37**, 228.
- [5] HELMS (K.) et POUND (G. S.). *Virology*, 1955, **1**, 408.
- [6] COMMONER (B.), MERCIER (F. L.), MERRILL (P.) et ZIMMER (A. J.). *Arch. Bioch. Biophys.*, 1950, **37**, 271.
- [7] GAUTHERET (R.-J.). *Manuel technique de culture des tissus végétaux*, Masson, édit., Paris, 1942.
- *[8] WHITE (Ph. R.). *A handbook of plant tissue culture*. The Jaques Cattell Press, édit., Lancaster, Pennsylvania, 1943.
- [9] SEGRETAIN (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 594.
- [10] MOREL. *Ann. Epiph.*, 1948, **14**, mémoire n° 5.
- [11] SEGRETAIN (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1342.
- [12] PARIS (D.) et DUHAMET (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 1690.
- [13] RIKER et GUTSCHE. *Am. J. Bot.*, 1948, **35**, 227.
- [14] LIMASSET (P.) et CORNUET (P.). *Ann. Epiph.*, 1950, n° 3, 274.
- [15] MOREL (G.) et MARTIN (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1324.
- [16] BLACK (L. M.). *Virus tumors in plants growth*. 6th Growth Symposium, 1947, p. 79.
- [17] NICKELL (S. G.). *Colloque international sur la physiologie des cultures de tissus végétaux*, p. 307.

MÉTHODE DE PRÉPARATION DU CARDIOLIPIDE

par M. FAURE et M.-J. MORELEC-COULON (*).

(Institut Pasteur, Paris)

Devant assurer d'une manière régulière la fabrication d'anticorps à base de cardiolipide destinés au sérodiagnostic de la syphilis, nous avons cherché à simplifier la préparation de ce phosphatide de façon à obtenir aisément et avec un bon rendement un produit analogue à celui de Pangborn et répondant aux normes préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé [1].

La technique que nous utilisons actuellement est voisine de celle que nous avons publiée antérieurement [2]. Les modifications portent sur l'extraction de la poudre de cœur que nous réalisons par percolation et sur la méthode de fractionnement des acides phosphatidiques libres.

Le cœur renferme plusieurs acides phosphatidiques : des acides glycérophosphatidiques dont le cardiolipide et un acide glycéro-inositolphosphatidique dénué d'activité sérologique [3]. On élimine ce dernier composé grâce à l'insolubilité de sa forme acide dans l'éthanol. Le cardiolipide possède une fonction acide très forte, ce qui permet de former ses sels en milieu chlorhydrique ; par exemple, par addition de chlorure de baryum à la solution éthylique des acides glycérophosphatidiques, le cardiolipide se sépare sous forme de sel de baryum insoluble. Ces propriétés permettent de purifier le cardiolipide par un nombre restreint d'opérations.

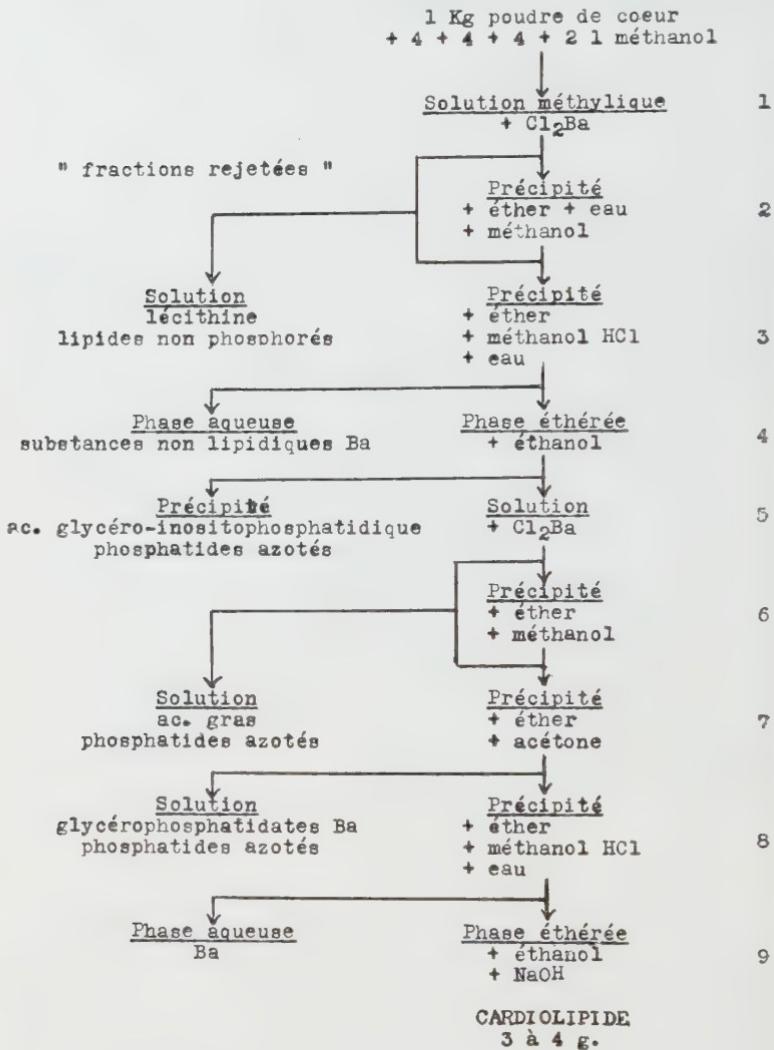
TECHNIQUE.

Nous résumons ci-dessous et dans le tableau ci-joint l'ensemble des manipulations qui sont toutes effectuées à la température du laboratoire. Les opérations de purification ne comportent que des dissolutions et des précipitations suivies de centrifugations brèves ; les produits provenant de 1 kg de poudre de cœur peuvent être traités dans un tube à centrifuger de 800 cm³.

5 kg de muscle cardiaque haché sont desséchés à l'état congelé (humidité résiduelle, 1 à 2 p. 100). On obtient 1 kg de produit que l'on pulvérise par passage forcé à travers un tamis à larges

(*) Manuscrit reçu le 25 avril 1956.

mailles. On place la poudre dans un percolateur avec 4 l de méthanol. Le lendemain et le surlendemain, on poursuit l'extraction par percolation avec 4 + 4 l de méthanol. Le troisième jour,



on introduit seulement 2 l de méthanol, on laisse écouler toute la solution et on exprime le résidu dans un pressoir.

1. Les solutions méthyliques sont additionnées d'une solution aqueuse de chlorure de baryum à 40 p. 100 jusqu'à cessation de

précipitation. On décante les solutions surnageant les précipités et l'on réunit ceux-ci dans un tube à centrifuger de 800 cm³.

2. Les sels de baryum bruts sont purifiés par dissolution dans de l'éther additionné d'eau et précipitation avec du méthanol. Cette opération est répétée trois fois avec les quantités suivantes de réactifs :

précipité + éther, 200 cm³ + eau q. s. dissolution (30 cm³ environ) + méthanol, 200 cm³; on centrifuge, on élimine la solution;

précipité + éther, 100 cm³ (+ eau, si nécessaire q. s. dissolution) + méthanol, 100 cm³; centrifugation;

précipité + éther, 100 cm³ (+ eau, si nécessaire) + méthanol, 100 cm³; centrifugation.

3. Les sels de baryum sont décomposés par une solution méthylique d'acide chlorhydrique (méthanol, 4 vol.; HCl concentré, 1 vol.). Par addition d'eau salée (ClNa, 2 p. 100), il se sépare une phase aqueuse renfermant le baryum et les impuretés non lipidiques et une phase éthérée concentrée contenant les acides phosphatidiques libres. Les réactifs : méthanol, HCl et eau salée sont préalablement refroidis à 4°.

précipité + éther, 150 cm³ + méthanol-HCl, 75 cm³ + (eau salée, 300 cm³ + méthanol, 75 cm³); on centrifuge, on élimine la phase aqueuse par décantation par aspiration;

phase éthérée + éther, 50 cm³ + méthanol-HCl, 50 cm³ + (eau salée, 200 cm³ + méthanol, 50 cm³); centrifugation, décantation de la phase aqueuse;

phase éthérée + (eau salée, 200 cm³ + méthanol, 100 cm³); centrifugation, élimination soigneuse de la phase aqueuse.

4. Les acides phosphatiques contenus dans la dernière phase éthérée qui est très concentrée sont fractionnés avec de l'éthanol; l'acide glycéro-inositophosphatidique précipite et le cardiolipide reste en solution.

phase éthérée + éthanol, 100 cm³; on centrifuge, on transvase la solution éthylique dans un autre tube à centrifuger;

précipité + éther, 15 cm³ + éthanol, 50 cm³; on centrifuge, on joint la deuxième solution éthylique à la précédente.

5. Le cardiolipide est précipité par addition d'un excès de chlorure de baryum que l'on introduit goutte à goutte sous la forme d'une solution hydrométhylique sursaturée de chlorure de baryum préparée extemporanément (méthanol, 10 vol.; eau, 2 vol.; Cl₂Ba, 40 p. 100, 2 vol.).

solutions éthyliques + solution hydrométhylique de Cl₂Ba, 20 cm³; on centrifuge, on élimine la solution surnageante.

6. Le sel de baryum précédent est purifié et déshydraté deux fois par dissolution dans de l'éther anhydre et précipitation par du méthanol anhydre. Lors de la deuxième dissolution dans l'éther, on obtient une solution gélatineuse.

précipité + éther, 30 cm³ + méthanol, 30 cm³; on centrifuge, on élimine la solution surnageante;

précipité + éther, 40 cm³ + méthanol, 40 cm³; on centrifuge, on élimine la solution.

Les opérations 3, 4, 5 et 6 doivent obligatoirement être effectuées dans la même journée.

7. On achève la purification et la décoloration du sel de baryum du cardiolipide par dissolution dans l'éther anhydre et précipitation par de l'acétone anhydre :

précipité + éther, 40 cm³ + acétone, 40 cm³; on centrifuge, on élimine la solution;

précipité + éther, 25 cm³ + acétone, 25 cm³; on centrifuge, on élimine la solution.

8. Le sel de baryum du cardiolipide est converti en sel de sodium. On libère l'acide phosphatidique par action d'une solution méthylique d'acide chlorhydrique (méthanol, 9 vol.; HCl concentré, 1 vol.) et d'eau salée (ClNa, 2 p. 100). On le dissout dans de l'éthanol et on neutralise sa solution par addition d'une solution éthylique de soude (N environ) :

précipité + éther, 50 cm³ + eau q. s. obtention d'une solution fluide (2 cm³ environ) + méthanol-HCl, 50 cm³ + eau salée, 100 cm³; on centrifuge, on élimine la phase aqueuse;

phase éthérée + éther, 25 cm³ + méthanol-HCl, 50 cm³ + eau salée, 100 cm³; on centrifuge, on élimine la phase aqueuse;

phase éthérée + méthanol, 25 cm³ + eau salée, 50 cm³; on centrifuge, on élimine soigneusement la phase aqueuse;

9. Phase éthérée évaporée à sec par un jet d'azote ou de gaz carbonique;

résidu d'évaporation dissous dans 500 cm³ d'éthanol et neutralisé par addition de la solution éthylique de soude jusqu'à virage d'un papier au tournesol humidifié.

Cette solution éthylique de cardiolipide est mise dans une glacière à +4°. Après quarante-huit heures, on la filtre pour éliminer un petit dépôt insoluble et on détermine sa concentration en cardiolipide.

On obtient 3 à 4 g de cardiolipide incolore présentant les caractéristiques suivantes : phosphore, 4,1 à 4,2 p. 100; azote ≤ 0,03 p. 100; indice d'iode, 120 à 125; ose, néant; inositol,

néant ; fonction acide/phosphore ≈ 1 ; acides gras/phosphore ≈ 2 ; glycérol/phosphore $\approx 1,5$ (1).

RÉSUMÉ.

On décrit en détail une méthode permettant de préparer rapidement et aisément le cardiolipide :

a) Le muscle cardiaque desséché à l'état congelé est extrait pendant trois jours par percolation avec du méthanol à la température du laboratoire ;

b) La purification du cardiolipide est réalisée en deux ou trois jours à l'aide d'opérations ne faisant appel qu'à des centrifugations. On élimine successivement les lipides non phosphorés et la lécithine, les substances non lipidiques, les phosphatides renfermant de l'azote ou de l'inositol et les impuretés colorées.

A partir de 1 kg de cœur sec (= 5 kg de muscle frais), on obtient 3 à 4 g de cardiolipide.

SUMMARY.

Description of a method which allows to prepare cardiolipid rapidly and easily.

a) The cardiac muscle is freeze-dried, then extracted during three days by percolation with methanol, at room temperature.

b) The precipitation of the cardiolipid is performed in two to three days by means of operations involving only centrifugation. The following compounds are successively eliminated : non phosphorated lipids, lecithin, non lipidic substances, phosphatides which contain nitrogen or inositol, finally the coloured impurities.

From 1 kg dry heart (= 5 kg fresh muscle) 3 to 4 g of cardiolipid can be obtained.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PANGBORN (M. C.) et coll. *Cardiolipin Antigens*, WHO Monograph series, Genève, 1955.
- [2] FAURE (M.) et COULON (M.-J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 533.
- [3] FAURE (M.) et MORELEC-COULON (M.-J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 411.
- [4] FAURE (M.) et MORELEC-COULON (M.-J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 1104.

(1) Ces rapports ont été établis à l'aide de la technique décrite dans [4].

**SUR L'ACTION BACTÉRICIDE
DE LA PÉNICILLINE, DE LA STREPTOMYCINE
ET D'UN MÉLANGE SYNERGIQUE
DE PÉNICILLINE ET DE STREPTOMYCINE.**

par R. LINZ et E. LECOCQ (*)

*(Laboratoire de Bactériologie de l'Université Libre de Bruxelles
et Laboratoire de Biologie Clinique
de l'Hôpital Universitaire Saint-Pierre, Bruxelles)*

De nombreux facteurs modifient l'action bactéricide de la pénicilline, de la streptomycine ou de leurs mélanges. L'objet du présent mémoire est d'étudier quelques-uns de ceux qui agissent *in vitro*.

★ ★

SOUCHES ET TECHNIQUES.

Trois souches de bactéries ont été employées : *Staphylococcus pyogenes* Oxford, sensible à la pénicilline et à la streptomycine ; *Staphylococcus pyogenes* W, modérément résistant à la pénicilline, modérément sensible à la streptomycine et sensible à un mélange des deux antibiotiques ; *Escherichia coli* K12, plus résistant à la pénicilline et sensible à la streptomycine. Des cultures développées à 37° sur bouillon gélosé (« heart infusion agar » Difco) sont conservées à la glacière et servent à préparer des cultures fraîches sur gélose inclinée. Ces dernières, après quinze à dix-huit heures d'étauve, sont émulsionsnées dans 10 cm³ de solution physiologique stérile (NaCl 0,9 p. 100). La suspension contient 10⁹ à 10¹⁰ germes par centimètre cube ; on la dilue au 1/10 000 et on introduit 0,05 cm³ de cette dilution dans chaque centimètre cube de bouillon à ensemencer. Celui-ci contient ainsi, par centimètre cube, 5 × 10³ à 5 × 10⁴ bactéries.

Le bouillon utilisé est, sauf indication du contraire, du « brain heart infusion » Difco. C'est un bouillon riche, très favorable

(*) Manuscrit reçu le 14 mai 1956.

à la multiplication des bactéries ; celle-ci n'y est inhibée que par une concentration relativement forte de streptomycine.

Les antibiotiques (sulfate de streptomycine et sel potassique de pénicilline G du commerce) sont ajoutés dans les tubes de bouillon à des concentrations décroissantes, chaque tube contenant la moitié de la concentration du tube précédent.

Les concentrations minimum bactériostatiques et les concentrations minimum bactéricides pour les trois souches figurent dans le tableau I.

TABLEAU I. — Concentrations bactériostatiques et bactéricides minimum de la pénicilline et de la streptomycine pour les trois souches utilisées.

	<u>Staphyl. pyogenes</u> Oxford	<u>Staphyl. pyogenes</u> W	<u>Esch. coli</u> K 12
Concentr. bactériostatiques			
{ P	0.02	1.25 à 2.5	31 à 62
{ S	0.5	1.25 à 2.5	1
Concentrat. bactéricides			
{ P	0.02	5 à 10	31 à 62
{ S	5 à 20	10 à 40	5
P + S		po.6 + so.31 à o.62	-

P : pénicilline, en unités Oxford par centimètre cube ; S : streptomycine, en microgrammes par centimètre cube. Les mêmes notations seront utilisées dans les tableaux suivants.

L'action bactéricide a été mesurée par la méthode de Chabbert [4]. Celle-ci consiste, rappelons-le, à prélever une anse de la culture à examiner, à tracer avec elle une ligne d'environ 5 cm sur de la gélose nutritive et à comparer la densité des colonies développées sur ces traits (survivants) avec la densité des colonies sur des traits semblables faits la veille, avant incubation, au moyen de dilutions connues du bouillon témoin, sans antibiotique, mais ensemencé. Dans nos expériences, ce liquide témoin non dilué fournit un grand nombre de colonies distinctes, mais serrées ; après dilution au dixième, 10 à 15 colonies bien séparées ; après dilution au centième, 1 à 4 colonies ; après dilution au millième, il ne donne plus aucune colonie. Un effet bactéricide n'a été considéré comme suffisant que si, au maximum,

0,1 p. 100 des bactéries survivent (tableau I). Ce n'est que dans ce cas, d'ailleurs, que les bouillons sont restés limpides lorsqu'on prolonge l'incubation.

L'action bactéricide de la pénicilline est moins régulière que son action bactériostatique. Il arrive parfois, en effet, que 100 p. 100 des bactéries survivent dans un tube riche en pénicilline, alors qu'un effet bactéricide se manifeste dans un tube moins riche. Il est possible qu'il s'agisse d'un phénomène semblable à celui décrit par Eagle [2, 3], mais alors l'expérience était rejetée.

Les concentrations nécessaires pour qu'une action synergique de la pénicilline et de la streptomycine se manifeste ont été cherchées comme suit. On dispose de plusieurs lots de bouillon contenant des concentrations différentes de pénicilline. De chacun, on prépare des gammes de tubes de 1 cm³ additionnés de streptomycine à concentrations décroissantes. On ensemence de *Staph. pyogenes* W (environ 10⁴ bactéries par tube). On apprécie la proportion des survivants après vingt à vingt-quatre heures d'étauve. On voit ainsi que, pour cette souche, le mélange de 0,6 unité Oxford de pénicilline avec 0,31 à 0,62 µg de streptomycine (notation : P 0,6+ S 0,31 à 0,62) produit le même effet bactéricide dans 1 cm³ de bouillon (0,1 p. 100 de survivants) que 5 à 10 U. O. de pénicilline seule ou 10 à 40 µg de streptomycine seule (tableau I).

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

I. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE. — Trois milieux liquides sont utilisés : le bouillon usuel (« brain heart infusion », en abrégé BHI), le même bouillon dilué au 1/50 en eau distillée (BHI 1/50) et un bouillon de valeur nutritive intermédiaire (« nutrient broth Difco » ou NB). De chaque milieu on prépare des séries de tubes de 1 cm³ additionnés de concentrations convenables des antibiotiques, et on ensemence. Les résultats figurent au tableau II.

On sait que l'action bactériostatique de la pénicilline ne dépend pas du milieu de culture, tandis que celle de la streptomycine est d'autant plus faible que le milieu est plus favorable à la multiplication des bactéries. Pareillement, on voit que l'action bactéricide de la pénicilline est indépendante du milieu, et que celle de la streptomycine est moindre dans un milieu pauvre que dans un milieu riche. Le mélange synergique de pénicilline et de streptomycine se comporte comme la streptomycine seule : dans 1 cm³ de bouillon BHI contenant 0,6 U. O. de pénicilline, il faut 0,62 µg de streptomycine pour que survivent seulement 0,1 p. 100 de staphylocoques, mais dans du bouillon NB il en faut 0,08 µg, et dans du bouillon BHI dilué au 1/50, 0,04 µg. On constate donc

une inhibition par les mêmes facteurs qui inhibent la streptomycine. Mais il existe un mélange synergique dans chacun des milieux essayés : la concentration de streptomycine nécessaire est toujours beaucoup moins grande en présence de pénicilline qu'en l'absence de celle-ci.

TABLEAU II. — Action de la pénicilline et de la streptomycine dans différents milieux de culture.

	Staph. pyogenes		Staph. pyogenes			Esch. coli	
	Oxford		W			K 12	
	BHI	NB	BHI	BHI	NB	BHI	NB
P. C. stat.	0.02	0.02	1.25	1.25	1.25	50.0	50.0
{ C. cide	0.04	0.02	10.0	10.0	2.5	50.0	50.0
S. C. stat.	2.5	0.31	2.5	0.02	0.31	5.0	0.31
{ C. cide	10.0	0.62	10.0	0.31	0.62	5.0	0.31
P. 0.6 + S. variable							
C. stat.	-	-	0.16	0.005	0.01	-	-
{ C. cide	-	-	0.62	0.04	0.08		

C. stat. : concentration bactériostatique minimum ; C. cide : concentration bactéricide minimum (0,1 p. 100 de survivants) ; P. 0.6 + S. : seule la concentration de streptomycine dans le mélange figure dans les colonnes de ce tableau et des tableaux suivants.

II. INFLUENCE DE L'AGE DES BACTÉRIES. — Des cultures en bouillon de *Staph. pyogenes* W maintenues à l'étuve à 37° pendant huit heures, vingt-quatre heures ou cinq jours, sont troubles et les troubles sont semblables à l'œil nu. Ces cultures fournissent approximativement le même nombre de colonies par la méthode de Chabbert [4] au long des traits sur gélose : les colonies confluent lorsque les cultures ont été diluées moins de dix mille fois ; il y a une vingtaine de colonies lorsqu'elles ont été diluées à 1/100 000, 2 à 4 colonies lorsqu'elles ont été diluées à 1/1 000 000 et aucune colonie lorsqu'elles ont été diluées davantage.

A des échantillons de 1,8 cm³ des cultures non diluées on ajoute 0,2 cm³ de solutions aqueuses de pénicilline, de streptomycine ou de solution physiologique (témoin). Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, on prépare des dilutions de ces mélanges et on étale une anse de chacune sur gélose nutritive. On calcule la proportion des survivants d'après la densité des colonies sur les traits (tableau III).

La richesse en bactéries a rendu nécessaire l'emploi de concentrations énormes d'antibiotiques. Néanmoins, on semble autorisé

à conclure : 1^o que la culture jeune (8 heures) est plus sensible à la pénicilline que les cultures plus âgées (24 heures et 5 jours) ; 2^o qu'au contraire, la culture vieillie (5 jours) est beaucoup plus sensible à la streptomycine que la culture jeune (8 heures).

Un essai sur *Esch. coli* K 12 a abouti aux mêmes résultats.

TABLEAU III. — Proportion de survivants des cultures de *Staph. pyogènes* W d'âges différents additionnées d'antibiotiques.

Antibiotiques, concentr. par cm ³	Proportion des survivants (p.cent)		
	Cultures de 8 heures	Cultures de 24 heures	Cultures de 5 jours
P 20.000	I	100	100
2.000	100	100	100
200	100	100	100
S 10.000	100	10	0.0001
1.000	100	100	0.01
100	100	100	I
Témoin (0)	100	100	100

La différence de sensibilité entre les cultures jeunes et vieilles est due aux cellules elles-mêmes, et non pas à un facteur diffusible dans le milieu. En effet, centrifugeons des cultures en bouillon de *Staph. pyogenes* W maintenues à 37°, l'une pendant huit heures, l'autre pendant vingt-quatre heures, une troisième pendant douze jours ; décantons les liquides surnageants et réservons les culots microbiens.

a) Les liquides surnageants sont stérilisés par filtration (filtres Seitz) et répartis en tubes de 1 cm³. On ajoute de la pénicilline ou de la streptomycine et on ensemence de la manière habituelle. Des séries de tubes témoins contiennent, ou bien des filtrats, ou bien du bouillon neuf. Après vingt-quatre heures à 37°, on compare les effets bactéricides des quatre séries de tubes.

b) Les staphylocoques sédimenés par centrifugation sont mis en suspension dans de la solution physiologique. Les suspensions sont ajustées au turbidimètre de sorte que 0,05 cm³ d'une dilution convenable contienne environ 5×10^4 cellules, et cette dose est introduite dans des tubes de 1 cm³ de bouillon neuf additionné de pénicilline ou de streptomycine. On cherche quelles concentrations sont nécessaires pour tuer au moins 99,9 p. 100 des germes en vingt-quatre heures à 37°.

Le tableau IV montre que les filtrats des cultures sont dépourvus d'influence. Les cellules bactériennes, au contraire, font preuve de sensibilités différentes selon leur âge : les plus jeunes sont plus

sensibles à la pénicilline, les plus vieilles à la streptomycine.

Des résultats analogues ont été obtenus avec *Esch. coli* K 12.

Il est tentant de mettre les modifications de la sensibilité des cellules d'âge différent en relation avec leurs facultés de division :

TABLEAU IV. — Action de la pénicilline et de la streptomycine sur *Staph. pyogenes* W ; filtrats de culture et sédiments cellulaires.

Nature de la semence	Milieux de culture	Conc. bactéricides	
		P	S
- Cult. sur gélose nutritive	Bouillon neuf	2.5	10
- id.	Filtrat culture W de 8 heures	2.5	10
- id.	Filtrat culture W de 24 heures	2.5	10
- id.	Filtrat culture W de 12 jours	2.5	10
- Sédiment cellules W de 8 heures	Bouillon neuf	0.31	10
- Sédiment cellules W de 24 heures	Bouillon neuf	2.5	10
- Sédiment cellules W de 12 jours	Bouillon neuf	2.5	0.62

les cellules jeunes, qui se divisent rapidement, sont plus sensibles à la pénicilline ; les cellules âgées, qui se divisent lentement, sont plus sensibles à la streptomycine.

III. ACTIVITÉ BACTÉRICIDE ET TEMPS D'INCUBATION. — On mesure habituellement l'effet bactéricide après une incubation d'un jour à 37°. Qu'observe-t-on lorsqu'on modifie cette durée d'incubation ?

Des tubes de 1 cm³ de bouillon contenant des concentrations différentes de pénicilline, de streptomycine ou de leur mélange, sont ensemencés comme précédemment. Ils sont portés au bain-marie à 37°. Des prélèvements sont faits périodiquement au moyen d'une anse et étalés sur de la gélose nutritive pour compter la proportion des survivants. Les trois souches étudiées se comportent de la même façon.

La mortalité dans des cultures additionnées de streptomycine ou de pénicilline n'est pas immédiate, sauf si les concentrations des antibiotiques sont élevées ; même alors une proportion importante

de germes restent vivants quelque temps. L'action bactéricide progresse avec la durée de l'incubation (*Cf.* Schönfeld [10]). Pour que 99,9 p. 100 de la population soient tués, il faut attendre une à quarante-huit heures suivant les souches et les concentrations des antibiotiques. Selon la souche bactérienne considérée, c'est la pénicilline (tableau V) ou la streptomycine (tableau VII) qui exerce l'effet le plus rapide. L'effet bactéricide d'un mélange synergique de pénicilline et de streptomycine est progressif, lui aussi (tableau V).

TABLEAU V. — Mortalité dans des cultures de *Staph. pyogenes* W additionnées de pénicilline et de streptomycine.

Antibiotiques concentr. par cm ³	avant incub.	Proportion de survivants (p. cent)						
		30 min.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.	24 h.	48 h.
P 80	I.O	I	I	I	0.I	0.I	0.I	0.I
20	100	100	100	100	10	I	I	0.I
10	100	100	100	100	I	I	I	0.I
5	100	100	100	100	I	100	I00	I00
2.5	100	100	100	100	I	I00	I00	I00
1.25	100	100	100	100	I0	>I00	>I00	>I00
0.62	100	100	100	100	I00	>I00	>I00	>I00
S 40	I00	I0	I	0.I	0.I	0.I	0.I	0.I
20	100	100	100	I	I	0.I	0.I	0.I
10	100	100	100	I00	I	0.I	0.I	0.I
5	100	100	100	I00	I0	I	I00	I00
2.5	100	100	100	I00	I00	I00	I00	I00
P 0.6+S 10	I00	I0	I0	I	I	0.I	0.I	0.I
5	100	100	100	I00	I0	I	0.I	0.I
2.5	100	100	100	I00	I00	I	0.I	0.I
1.25	100	100	100	I00	I00	I0	0.I	0.I
0.62	100	100	100	I00	I00	I00	0.I	0.I
0.31	100	100	100	I00	I00	I00	0.I	I00
0.16	100	100	100	I00	I00	>I00	>I00	>I00
Témoin (0)	100	100	100	I00	>I00	>I00	>I00	>I00

Il arrive parfois que la population vivante décline d'abord, mais s'accroît ensuite. C'est le cas, dans le tableau V, des tubes qui contiennent 5 et 2,5 unités de pénicilline, 2,5 µg de streptomycine, ou le mélange de 0,62 unité de pénicilline et de 0,31 µg de streptomycine. On assiste à une dépopulation passagère, suivie d'une multiplication. Chacune des trois souches étudiées présente le phénomène. Celui-ci ne se produit que lorsque les concentrations des antibiotiques sont faibles, proches des concentrations dépourvues d'action bactéricide. Le moment où l'accroissement succède à la décroissance est variable. La proportion des microbes vivants peut tomber à 10, 1 ou 0,1 p. 100 après quatre à vingt-quatre heures d'incubation et remonter à 100 p. 100 ou davantage à la vingt-quatrième ou à la quarante-huitième heure.

Des numérations plus exactes des cellules vivantes ont été entre-

prises, par comptage des colonies qu'elles sont capables de former sur gélose nutritive. A titre d'exemple, citons l'expérience suivante.

Des ballons de 95 cm³ de bouillon contenant de la pénicilline à des concentrations différentes reçoivent chacun 5 cm³ d'une suspension de *Staph. pyogenes* W. L'incubation se fait dans un bain-marie à 37°, le niveau de l'eau dépassant celui du bouillon des ballons. Avant l'incubation, et après une, deux, quatre, cinq et vingt-quatre heures de bain-marie, on prélève 5 cm³ de chaque ballon. Cinq échantillons de 0,5 cm³ de liquide à dilution convenable sont mélangés avec de la gélose nutritive fondu et coulés en boîtes de Petri (méthode de la double couche de Gratia [4]). Après solidification et incubation de deux jours à l'étuve à 37°, on compte les colonies et calcule la richesse de chaque échantillon en bactéries vivantes en fonction de la richesse initiale avant incubation (tableau VI).

TABLEAU VI. — Nombre de Bactéries vivantes par centimètre cube des cultures en bouillon de *Staph. pyogenes* W additionnées de pénicilline.

Pénicilline (concentr. en U.O./cm ³)	Proportion (p.cent) de bactéries vivantes (+) après incubation de					
	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.
0 (témoin)	112	232	3360	8700	77600	276000
2.5	68	56	19	3	14	240000
5.0	89	112	16	1	0.4	0
10.0	64	44	22	3.4	0.04	0
20.0	68	88	8.8	2.3	0.04	0

(+) Les concentrations en bactéries vivantes sont exprimées en proportion (p. 100) de la concentration mesurée avant incubation. Celle-ci (100 p. 100) était de 24 800 bactéries par centimètre cube ; 0 : Aucune colonie, même à partir de culture non diluée.

Cette expérience confirme la précédente : dans le ballon additionné de 2,5 U. O. de pénicilline par centimètre cube, la proportion des bactéries vivantes est de 3 p. 100 après six heures d'incubation, de 14 p. 100 après huit heures et de 240 000 p. 100 après vingt-quatre heures.

Des résultats semblables ont été obtenus en remplaçant la pénicilline par la streptomycine, *Staph. pyogenes* W par *Staph. pyogenes* Oxford ou *Esch. coli* K 12. Ils le restent encore lorsqu'on utilise une semence beaucoup plus riche et des concentrations d'antibiotiques appropriées. Par exemple, ensemencons $3,12 \times 10^8$ staphylocoques de la souche Oxford par centimètre

cube de bouillon (tableau VII). Pour estimer la proportion des survivants par la technique de Chabbert [1], il faut, cette fois-ci, préparer de nombreuses dilutions de chaque culture, prélever une anse de chacune et comparer avec les dilutions du témoin avant incubation. L'action bactéricide peut être rapide (tube S400), ou

TABLEAU VII. — Action bactéricide de la pénicilline et de la streptomycine sur *Staph. pyogenes Oxford* (semence : $3,12 \times 10^8$ cellules par centimètre cube).

Antibiotiques et concentrations	Proportion (p.cent) des survivants après incubation à 37° de			
	1 heure	6 heures	24 heures	48 heures
P 0.32	100	1	0	0
0.08	100	100	0	0
0.02	100	10	0	0
0.005	>100	>100	>100	>100
S 400	0.001	0	0	0
100	1	0.01	0.001	0
25	100	1	>100	>100
Témoin (0)	>100	>100	>100	>100

0 : Proportion de survivants : $\ll 0,00001$ p. 100.

lentement progressive (S100), ou comporter une dépopulation suivie d'accroissement (S25).

La multiplication qui prend place après la dépopulation passagère devrait être due à des bactéries devenues résistantes aux antibiotiques. On sait que les survivants ne sont pas moins sensibles que les germes tués ; mais ils ne se sont pas multipliés, ils ont simplement survécu. Ici, on a affaire à des cellules qui ont prolifié en présence des antibiotiques. A priori, rien ne s'oppose à ce que des résistants puissent se développer : ou bien, il y avait des bactéries résistantes (dues à des mutations spontanées) au sein de la population ensemencée, et elles ont non seulement survécu, mais se sont divisées ; ou bien, dans une autre hypothèse, des conditions favorables à l'acquisition active de la résistance ont permis aux germes de se transformer et de se multiplier.

Voyons donc comment se comportent les populations qui se sont multipliées après une diminution passagère.

Reprendons l'expérience résumée dans le tableau V. Sur gélose nutritive sans antibiotique, au long des traits ensemencés avec les cultures en bouillon, se sont développées des colonies plus ou

moins séparées. Considérons les lignées issues des bouillons additionnés de streptomycine, seule ou mélangée avec la pénicilline, après diverses durées d'incubation. Préparons des suspensions des colonies de chaque trait en solution physiologique et introduisons environ 5×10^4 germes dans des tubes de 1 cm^3 de bouillon contenant 80, 40, ... 2,5 et 0 µg de streptomycine. Nous cherchons quelle sera la concentration bactériostatique pour chaque lignée (lecture après vingt-quatre heures à 37°, tableau VIII).

TABLEAU VIII. — Concentrations de streptomycine bactériostatiques pour les lignées issues de cultures du tableau V (concentrations en µg/cm³).

Age des cultures en bouillon au moment où les lignées ont été obtenues	Concentrations de la streptomycine dans les cultures en bouillon dont les lignées sont issues					
	S 10	S 5	S 2.5	P 0.6+ S 1.25	P 0.6+ S 0.30	P 0.6+ S 0.16
0 min.	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25
1 heure	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25
2 heures	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25
4 heures	-	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25
6 heures	-	I.25	I.25	I.25	I.25	I.25
24 heures	-	I.25	I.25	-	-	I.25
48 heures	-	40.0	2.5	-	80.0	I.25

— : L'essai n'a pu être fait, puisqu'il n'y avait aucune colonie sur gélose (survivants < 0,1 p. 100).

Les lignées issues des tubes de bouillon qui contenaient 10 µg de streptomycine par centimètre cube sont toutes sensibles, quel qu'ait été le moment des prélèvements. Il en va de même pour celles issues des tubes de bouillon contenant 5 µg/cm³. Quant à celles qui proviennent des tubes avec 2,5 µg/cm³, sont sensibles uniquement celles obtenues pendant les vingt-quatre premières heures d'incubation, c'est-à-dire pendant la phase de dépopulation ; au contraire, la lignée obtenue après quarante-huit heures d'incubation (moment où la population s'était accrue) est résistante. Pareillement, les lignées issues des bouillons contenant à la fois de la pénicilline et de la streptomycine sont sensibles si elles ont été obtenues pendant la phase de dépopulation ; elles sont résistantes quand la population a ensuite augmenté.

Il semble donc que la multiplication secondaire soit le fait de bactéries résistantes. Remarquons d'ailleurs (tableau VIII) que la

résistance a toujours accompagné l'accroissement secondaire de la population et qu'elle ne l'a jamais précédé.

Des constatations identiques sont faites sur *Esch. coli* K 12. Dans un tube de bouillon additionné de 2,5 µg de streptomycine par centimètre cube, le nombre de bactéries décroît pendant les quatre premières heures d'incubation et croît à partir de la sixième heure. Les prélèvements durant la phase décroissante donnent des colonies sensibles à la streptomycine, ceux de la phase de multiplication secondaire, des colonies résistantes.

Cependant, en présence de pénicilline aussi, le nombre des bactéries vivantes fléchit d'abord et croît ensuite (tableaux V, VI, VII). Or, à aucun moment on n'a constaté que les bactéries deviennent résistantes à la pénicilline. Il faut donc conclure que l'acquisition de la résistance n'est pas toujours la cause du phénomène.

IV. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTION BACTÉRICIDE. — Des séries de tubes de bouillon additionnés de pénicilline, de streptomycine ou des deux antibiotiques, sont ensemencées et portées, les unes à l'étuve à 37°, les autres dans une chambre froide à +4° C (température à laquelle la population d'un tube témoin sans antibiotique ne se modifie guère en dix jours).

Alors qu'à 37° les antibiotiques agissent aux doses décrites plus haut, ces doses n'exercent aucun effet bactéricide à 4°. Mais si on laisse à la glacière pendant cinq jours des tubes contenant, par centimètre cube, 1 000 unités de pénicilline, 1 000 µg de streptomycine, ou 0,6 U. de pénicilline plus 100 µg de streptomycine, il ne survit que 0,1 p. 100 des bactéries ensemencées : en d'autres termes, il faut utiliser vingt à cent fois plus d'antibiotique à 4° qu'à 37°.

V. INFLUENCE DE LA DILUTION TARDIVE. — Comme pour *Pseudomonas aeruginosa* [5], l'action inhibitrice de la streptomycine sur des cultures en bouillon de *Staph. pyogenes* W devient irréversible après quatre heures à 37° [6].

En effet, préparons des solutions en bouillon de streptomycine de concentrations décroissantes (160, 80, 40, ...0 µg/cm³) ; ensemencons chacune avec $4,1 \times 10^4$ staphylocoques de la souche W par centimètre cube ; répartissons en tubes de 0,5 cm³. Une première série (témoin) de tubes est portée à l'étuve telle quelle. Les tubes d'une deuxième série reçoivent 7,5 cm³ de bouillon neuf stérile avant l'incubation ; vingt à trente minutes se sont écoulées à la température de la chambre, avant cette dilution au 1/16. Les séries n°s 3, 4 et 5 sont portées à l'étuve en même temps que la série n° 1, mais en sont retirées, la troisième après deux heures, la quatrième après quatre heures, la cinquième après

vingt-quatre heures, pour que $7,5 \text{ cm}^3$ de bouillon pur soient versés dans chacun de leurs tubes ; puis elles sont replacées dans l'étuve. Tous les tubes sont examinés vingt-quatre heures après la dilution. On note lesquels sont restés limpides (effet bactériostatique) et on ensemence une anse sur gélose afin d'estimer leur proportion de survivants (effet bactéricide) [tableau IX].

TABLEAU IX. — Effet de la dilution sur l'action de la pénicilline et de la streptomycine sur *Staph. pyogenes* W.

Antibiotiques, et moment de la dilution	Concentrations bactériostatiques apparentes (x)	Concentrations bactéricides apparentes (x)
P pas de dilution	5	5
{ dilut. avant incubation	0.62	0.62
" après 2 heures	0.16	0.31
" après 4 heures	0.16	0.31
" après 24 heures	0.16	0.31
S pas de dilution	2.5	10
{ dilut. avant incubation	5	10
" après 2 heures	5	5
" après 4 heures	0.31	1.25
" après 24 heures	0.16	0.62

P : En unités Oxford par centimètre cube ; S : en μg par centimètre cube ; (x) les concentrations, là où il y a eu dilution, sont calculées en tenant compte de celle-ci.

Dans la première série, il faut $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pour que 0,1 p. 100, au maximum, des germes survivent. Tant que l'effet de la streptomycine ne sera pas devenu irréversible, le même résultat ne sera atteint que dans le bouillon additionné de $160 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, s'il a été dilué au 1/16. C'est ce qui se passe dans la deuxième série. Au contraire, dans la cinquième série (dilution après vingt-quatre heures), même dans le tube qui contenait $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ avant dilution, soit $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ après dilution au 1/16, il n'y a que 0,1 p. 100 de survivants. Dans la série témoin, sans dilution, on voit que $0.62 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ est une concentration dépourvue d'action bactéricide. Il faut donc conclure que l'effet bactéricide de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ était manifesté au moment où la dilution est intervenue. L'étude des séries 3 et 4 montre que l'action bactériostatique et bactéricide ne peut plus être modifiée par dilution au 1/16 à partir de la quatrième heure d'incubation.

A vrai dire, il y a une cause d'erreur : en même temps que

l'antibiotique est dilué, la concentration microbienne est également ramenée au 1/16, et après l'addition de 15 volumes de bouillon, le nombre des survivants pourrait être de 1,6 p. 100, et non pas 0,1 p. 100 de la semence. Le nombre des cellules capables de former des colonies sur gélose nutritive a montré cependant que les survivants étaient vraiment réduits à moins de 0,1 p. 100 (0 à 2 colonies par centimètre cube pour une semence de $4,1 \times 10^4$).

Lorsque l'effet bactéricide est « installé » les bactéries ne sont pas nécessairement mortes ; elles peuvent avoir subi seulement une modification telle que la mort à brève échéance soit certaine. On verra plus loin, à propos de la pénicilline, que tel peut être le cas. En outre, l'irréversibilité de l'action *bactériostatique* n'est pas nécessairement la conséquence de la mort des bactéries : ainsi, dans la cinquième série, les tubes restés limpides et où les concentrations après dilution sont de 0,16 et de 0,31 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ contiennent respectivement 1 et 10 p. 100 de staphylocoques vivants.

Une expérience semblable a porté sur la pénicilline (tableau IX). L'effet bactéricide, ici, s'installe encore plus vite : la dilution dans 15 volumes de bouillon pur n'est plus capable de modifier les résultats, quelquefois même après vingt à trente minutes de séjour à la température du laboratoire (18°) : les survivants sont réduits à 0,1 p. 100 dans les tubes contenant 10 ou 5 U. O./ cm^3 , c'est-à-dire, après dilution, 0,62 ou 0,31 U. O./ cm^3 , concentrations inefficaces dans la série témoin. Cette rapidité cadre bien avec la rapidité de fixation de la pénicilline par les corps microbiens.

VI. INFLUENCE DES INHIBITEURS DES ANTIBIOTIQUES. — Au lieu de diluer le contenu des tubes au moyen de bouillon pur, on peut neutraliser l'action de la streptomycine par l'addition d'une solution concentrée de chlorure de sodium. Or, *Staph. pyogenes* se multiplie dans un milieu contenant 6,5 p. 100 de NaCl. Ensemencons du bouillon avec *Staph. pyogenes* W (1 à 5 $\times 10^4$ cellules par centimètre cube), ajoutons de la streptomycine, répartissons en tubes de 1 cm^3 , et après des périodes variables d'incubation, introduisons dans chaque tube 0,2 cm^3 de solution stérile de NaCl presque saturée (32,5 p. 100) ; la concentration de NaCl réalisée sera de 5,4 p. 100. Que le sel soit introduit tout de suite ou après quatre heures d'étuve, il faut seize fois plus de streptomycine (40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, au lieu de 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) pour inhiber la multiplication des staphylocoques et huit fois plus (80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ au lieu de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) pour tuer 99,9 p. 100 de la population.

La dilution n'inactivait pas la streptomycine, si l'incubation

préalable avait duré quatre heures ; mais la salaison l'inactive, même après ce délai. Il y a donc contradiction.

Pour inhiber, ou plutôt pour détruire la pénicilline, servons-nous de pénicillinase. Préparons une solution de pénicillinase dont $0,05 \text{ cm}^3$ détruisent 200 U. O. de pénicilline dans $0,5 \text{ cm}^3$ de bouillon. Dans des tubes contenant 1 cm^3 de bouillon, 20 U. O. de pénicilline et environ 5×10^4 cellules de *Staph. pyogenes* W, maintenus pendant des temps variables à 37° , introduisons $0,05 \text{ cm}^3$ de pénicillinase. Même lorsque l'incubation préalable a duré vingt-quatre heures, le contenu des tubes se trouble en dix-huit heures à l'étuve. Il y a également contradiction avec l'expérience précédente : la dilution, on s'en souvient, même si elle est faite trente minutes après la préparation des mélanges, ne rend pas aux staphylocoques leur faculté de multiplication.

A quoi sont dues ces contradictions ? Si la pénicilline n'a pas tué les staphylocoques mais est adsorbée par eux [8], elle les empêche de se multiplier et fait croire ainsi qu'ils sont morts ; la pénicillinase, si elle détruit la pénicilline adsorbée, restaure la fonction de multiplication des germes. Ou bien, il se peut que la pénicillinase ayant détruit la pénicilline, les rares germes restés vivants (0,1 p. 100) se développent sans entrave. L'expérience suivante plaide en faveur de la dernière hypothèse.

Un ballon de 100 cm^3 de bouillon reçoit environ 4×10^4 staphylocoques de la souche W par centimètre cube ; c'est le ballon témoin (*T*). Un autre ballon semblable (*P*) a reçu en outre 10 unités de pénicilline par centimètre cube. Aussitôt après leur préparation (c'est-à-dire après dix minutes à la température du laboratoire, 18°) et après quatre heures et vingt-quatre heures d'incubation à 37° , on prélève de chaque ballon deux portions de 10 cm^3 ; la première est additionnée de $0,5 \text{ cm}^3$ de solution physiologique (*t*), la seconde de $0,5 \text{ cm}^3$ de pénicillinase (*p*). Pour chaque moment on a donc quatre tubes : *Tt*, *Tp*, *Pt* et *Pp*. On dénombre les germes vivants, capables de former des colonies sur gélose (tableau X) ; la gélose destinée à la numération des mélanges avec pénicillinase contient également $0,05 \text{ cm}^3$ de cet enzyme par centimètre cube.

On voit que, dans le ballon *P*, le nombre de bactéries capables de multiplication est tombé à 0,2 p. 100 après quatre heures à 37° et davantage encore après vingt-quatre heures ; il n'y a aucune différence entre les échantillons additionnés de pénicillinase et les autres. Le nombre des survivants est devenu très petit, mais il n'est pas nul.

Pourquoi la dilution au 1/16 en bouillon, qui ramène la pénicilline à des concentrations non inhibitrices, ne permet-elle pas la même multiplication que la pénicillinase qui détruit la pénicilline ? Les staphylocoques qui ont été en contact avec des

concentrations inhibitrices de pénicilline sont-ils « sensibilisés » à cet antibiotique au point de ne plus tolérer des concentrations inoffensives pour des staphylocoques normaux ? Du bouillon ensemencé de $3,7 \times 10^4$ cellules de *Staph. pyogenes* W par centimètre cube est versé dans trois fioles. Dans la fiole A il n'y a pas de pénicilline ; dans la fiole B, 0,5 U. O. de pénicilline par centimètre cube ; dans la fiole C, 5 U. O. de pénicilline par centimètre cube. Après trente minutes à la température du laboratoire, on prélève 4 échantillons de 1 cm³ de chaque fiole. Le

TABLEAU X. — Nombre de germes vivants par centimètre cube de cultures de *Staph. pyogenes* W additionnées ou non de pénicilline.

Moment des prélevements	Ballon témoin (T)		Ballon avec pénicilline (P)	
	Tube sans pénicillinase (T _t)	Tube avec pénicillinase (T _p)	Tube sans pénicillinase (P _t)	Tube avec pénicillinase (P _p)
10 minutes à la températ. du laborat.	395×10^2	383×10^2	339×10^2	335×10^2
4 heures à 37°	151×10^3	148×10^3	69	78
24 heures à 37°	381×10^6	406×10^6	<10 (+)	1.25

Moyenne de 4 boîtes de gélose. — (+) Aucune colonie ne s'est développée, mais la concentration de pénicilline (10 U. O./cm³) dans le ballon P est telle que 1 cm³ non dilué, mélangé à la gélose, pourrait empêcher des bactéries vivantes de former des colonies.

premier de ces échantillons est introduit dans un tube vide (témoin) ; le deuxième, dans un tube de 15 cm³ de bouillon ; le troisième, dans un ballon de 100 cm³ de bouillon ; le quatrième, dans un tube contenant 0,05 cm³ de pénicillinase. Tubes et ballons sont portés à l'étuve pendant deux jours et on note ceux qui se troublent (tableau XI). On constate : a) que 0,5 U. O. de pénicilline par centimètre cube (fiole B) n'inhibe pas la multiplication des staphylocoques ; b) que 5 U. O./cm³ (fiole C) l'inhibent (échantillon 1) ; c) que cette inhibition persiste lorsque le contenu de la fiole C est dilué au 1/16 (échantillon 2), bien que la concentration de la pénicilline tombe alors à 0,31 U. O./cm³, concentration inefficace (*Cf.* fiole B avec 0,5 U. O./cm³) ; d) que cette inhibition est cependant levée lorsqu'on dilue au 1/100 (échantillon 3) ou qu'on ajoute de la pénicillinase (échantillon 4). Dans les échantillons non traités ou dilués au 1/16 (n°s 1 et 2), la proportion des germes vivants ne dépasse pas 0,1 p. 100 de l'ensemencement.

Les résultats sont identiques quand on prélève les échantillons des fioles après une, quatre ou vingt et une heures d'incubation à 37°.

Le traitement des staphylocoques par la pénicilline à dose inhibitrice les sensibilise donc à certaines concentrations du même antibiotique non inhibitrices pour des cellules normales.

Une expérience sur la streptomycine conduit à des conclusions semblables.

TABLEAU XI. — Multiplication des bactéries dans des échantillons de bouillon ensemencés de *Staph. pyogenes* W.

Traitements des échantillons d'un cm ³ des 3 fioles	Fiole A (pas de pénicilline)	Fiole B (P 0.5)	Fiole C (P 5)
1) Aucun traitement	+	+	0
2) Mélange avec 15 cm ³ de bouillon	+	+	0
3) Mélange avec 100 cm ³ de bouillon	+	+	+
4) Mélange avec pénicilline	+	+	+

+ : trouble ; 0 : limpide ; P : pénicilline, en U. O./cm³.

VII. ASSOCIATION SYNERGIQUE DE LA PÉNICILLINE ET DE LA STREPTOMYCINE ; DILUTION TARDIVE ; INHIBITEURS. — Dans le cas de l'association synergique pénicilline-streptomycine, l'expérience de dilution exposée plus haut peut se faire de trois manières : a) si l'on ajoute 15 volumes de bouillon pur, on dilue à la fois les deux antibiotiques ; b) si l'on ajoute 15 volumes de bouillon contenant de la streptomycine à concentrations variables, chaque fois identique à la concentration de streptomycine dans le tube, on ne dilue que la pénicilline ; c) si l'on ajoute 15 volumes de bouillon contenant de la pénicilline à 0,60 U. O./cm³ (concentration présente dans tous les tubes, on ne dilue que la streptomycine. Les trois méthodes ont été utilisées [6] et ont fourni les résultats du tableau XII.

Des séries témoins montrent que l'effet bactéricide (0,1 p. 100 de survivants) exige, par centimètre cube, 5 U. O. de pénicilline, ou 10 µg de streptomycine, ou un mélange de 0,6 unité de pénicilline avec 0,62 µg de streptomycine. Il n'y a pas d'effet synergique si on mélange la streptomycine avec 0,038 U. O. de pénicilline par centimètre cube $\left(0,038 = \frac{0,6}{16}\right)$: il faut alors 10 µg de

streptomycine (série 5) comme lorsque cet antibiotique est utilisé seul (série 2). Si on dilue un mélange synergique avec du bouillon pur, même après quatre heures à 37°, toute action synergique

TABLEAU XII. — Influence de la dilution sur l'association synergique pénicilline-streptomycine.

(Tubes contenant environ $1,2 \times 10^4$ cellules de Staph. Pyogenes W)

Antibiotiques (tubes de 0.5 cm ³ sauf indication)	Nature du bouillon de dilution et moment de son addition	Concentrations bactériostat. apparentes (I)	Concentrations bactéricides apparentes (I)
I) P. concentr. variables	-	P 5	P 5
2) S. concentr. variables	-	S 2.5	S 10
3) P. 0.6+S variable Tubes 0.5cm ³	-	P 0.6+S 0.16	P 0.6+S 0.62
4) P. 0.6+S variable Tubes 8 cm ³	-	X	X
5) P. 0.038+S variable	-	P 0.038+S 2.5	P 0.038+S 10
6) P. 0.6+S variable	bouillon pur-avant	P 0.038+S 5	P 0.038+S 10
7) idem	bouillon pur 4 h.	P 0.038+S 1.25	P 0.038+S 5
8) idem	bouillon S avant	P 0.038+S 10	P 0.038+S 2.5
9) idem	bouillon S 4 h.	P 0.038+S 0.31	P 0.038+S 0.62
10) idem	bouillon P avant	X	X
11) idem	bouillon P 4 h.	X	X

P : pénicilline en U. O./cm³ ; S : streptomycine en µg/cm³ ; (I) : les concentrations, là où il y a eu dilution, sont calculées en tenant compte de celle-ci ; X : inhibition de la multiplication, même dans le tube témoin sans streptomycine (voir texte).

est perdue, et il faut autant de streptomycine, après dilution que dans la série témoin n° 2 (séries 6 et 7). Si on dilue avant incubation avec du bouillon additionné de streptomycine (série 8), l'effet synergique est partiellement perdu ; mais si on attend quatre heures, il persiste : la dilution ramène la concentration de pénicilline à 0,038 U. O./cm³, mais il ne survit que 0,1 p. 100 de

staphylocoques dans le tube contenant 0,62 µg de streptomycine par centimètre cube (série 9). Quant à la dilution au moyen de 15 volumes de bouillon additionné de 0,6 U. O. de pénicilline par centimètre cube (séries 10 et 11), elle ne permet aucune conclusion : les staphylocoques sont ensemencés en nombre tel (environ 2×10^4 par tube) qu'ils se multiplient aisément dans 0,5 cm³ de bouillon contenant 0,6 ou 2,5 U. O. de pénicilline par centimètre cube (séries 1 et 3), mais non pas dans 8 cm³ de bouillon contenant 0,6 U. O. de pénicilline par centimètre cube (série 4). Ils résistent à certaines quantités de pénicilline, probablement parce qu'ils sécrètent une pénicillinase, mais ils n'en sécrètent pas assez pour détruire $8 \times 0,6 = 4,8$ U. O. de pénicilline.

Dans d'autres expériences, la dilution a été remplacée par l'addition de chlorure de sodium (concentration finale : 5,4 p. 100) ou de pénicillinase. Le sel ne modifie guère la concentration bactéricide de la pénicilline (10 au lieu de 5 U. O./cm³), mais fait passer celle de la streptomycine de 5 à 80 µg/cm³. La pénicillinase ne modifie pas celle de la streptomycine (5 µg/cm³), mais détruit l'effet bactéricide, même de 160 U. O. de pénicilline par centimètre cube.

Si, après quatre heures d'incubation à 37°, on ajoute du chlorure de sodium (5,4 p. 100) à des tubes contenant des mélanges de pénicilline (0,6 U. O./cm³) et de streptomycine (à concentrations différentes), l'association synergique (P 0,6 + S 0,62) ne perd pas ses propriétés : on n'y retrouve que 0,1 p. 100 de survivants. Si, au lieu de sel, on ajoute de la pénicillinase, tout effet synergique est aboli : il faut 10 µg de streptomycine par centimètre cube pour que les survivants soient réduits à 0,1 p. 100. Il est difficile de dire si cela signifie que la pénicilline a plus d'importance pour la synergie que la streptomycine.

VIII. DANS L'ASSOCIATION PÉNICILLINE-STREPTOMYCINE, L'UN DES ANTIBIOTIQUES « PRÉPARE »-T-IL A L'AUTRE ? — La synergie de deux antibiotiques s'étudie d'habitude dans un mélange où les bactéries restent plongées pendant toute la durée de l'essai. Ce contact continu est-il nécessaire ? Ne peut-on traiter les germes par l'un des antibiotiques seul, à la même concentration que dans le mélange synergique, puis le retirer et lui substituer l'autre antibiotique seul, également à la même concentration que dans le mélange synergique ? En d'autres termes, la pénicilline « prépare »-t-elle *Staph. pyogenes* W à la streptomycine, ou la streptomycine à la pénicilline ?

Quatre types d'expériences ont été réalisés. Dans l'un, à du bouillon ensemencé et additionné de 0,6 U. O. de pénicilline par centimètre cube, on ajoute après quatre heures 15 volumes de bouillon contenant de la streptomycine à concentrations variables.

Dans un deuxième, à des tubes contenant de la pénicilline (0,6 U. O./cm³), on ajoute après quatre heures un petit volume d'un mélange de pénicillinase et de streptomycine. Dans un troisième, à des tubes contenant de la streptomycine à concentrations différentes, on ajoute après quatre heures un petit volume d'un mélange de solution concentrée de NaCl et de pénicilline (concentrations finales : NaCl, 5,4 p. 100 ; pénicilline, 0,6 U. O./cm³). Dans un quatrième, une purée de cellules de la souche W de *Staph. pyogenes* a été mise en suspension, soit dans des solutions de pénicilline (20 000 à 0,6 U. O./cm³), soit dans des solutions de streptomycine (10 000 à 0,6 µg/cm³), soit dans de la solution physiologique (témoin) ; après quatre heures d'incubation à 37°, chaque mélange a été centrifugé, et les cellules ont été lavées dans de la solution physiologique à plusieurs reprises, puis ensemencées, à raison de 1 à 5 × 10⁴ par centimètre cube, dans du bouillon additionné de pénicilline ou de streptomycine ou des deux antibiotiques.

Jamais il n'a été constaté que l'un des antibiotiques « préparait » à l'autre : après traitement par la pénicilline seule, il fallait 5 à 10 µg de streptomycine par centimètre cube pour tuer 99,9 p. 100 des staphylocoques, comme s'il n'y avait eu aucun traitement préalable ; et lorsqu'on traitait les germes par la streptomycine d'abord, et par 0,6 U. O. de pénicilline par centimètre cube ensuite, l'effet bactéricide ne se manifestait que là où la streptomycine l'avait déjà provoqué seule.

IX. RÉSISTANCE A LA STREPTOMYCINE ET SYNERGIE BACTÉRICIDE PÉNICILLINE-STREPTOMYCINE. — Si un mélange de pénicilline et de streptomycine jouit de propriétés bactéricides synergiques vis-à-vis d'une souche de bactéries, et si de cette souche on obtient un variant résistant à l'un des deux antibiotiques, peut-on encore trouver une association de pénicilline et de streptomycine douée de propriétés synergiques vis-à-vis de ce variant ?

Il est difficile d'exalter la résistance d'une souche à la pénicilline. Aussi l'expérience suivante a-t-elle porté sur deux variants de *Staph. pyogenes* W rendus résistants à la streptomycine. Des tubes de bouillon contenant de la pénicilline et de la streptomycine, seules ou mélangées, ont été ensemencés au moyen de 1 à 5 × 10⁴ cellules par centimètre cube, soit de la souche mère, sensible, soit de l'un des variants résistants (tableau XIII). Dans les mélanges, la pénicilline a été utilisée à la concentration constante de 0,6 U. O./cm³, comme précédemment, et la streptomycine à concentrations variables : en effet, les trois variants conservaient la même sensibilité à la pénicilline.

On voit qu'il existe un mélange synergique pour chaque variant,

mais que dans chacun de ceux-ci les concentrations de streptomycine sont différentes. Dans les mélanges bactéricides synergiques examinés, les concentrations de streptomycine sont de huit à trente-deux fois moins fortes que les concentrations nécessaires si la streptomycine est utilisée seule.

TABLEAU XIII. — Effets de la pénicilline et de la streptomycine sur trois variants de *Staph. pyogenes* W.

	VARIANTS		
	Normal	Résistant I	Résistant II
Concentrations bactériostatiques			
P seule	P 1.25	P 1.25	P 2.5
S seule	S 2.5	S 3I	S 500
P 0.6+ S variable	P 0.6+S 0.08	P 0.6+S 8	P 0.6+S 16
Concentrations bactéricides			
P seule	P 10	P 10	P 10
S seule	S 10	S 125	S 1000
P 0.6+ S variable	P 0.6+S 0.62	P 0.6+S 16	P 0.6+S 3I

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1° Le pouvoir bactéricide de la pénicilline, comme son pouvoir bactériostatique, dépend peu des qualités nutritives du bouillon de culture ; celui de la streptomycine, seule ou associée à la pénicilline, est d'autant moins marqué que le bouillon convient mieux à la multiplication des bactéries.

2° Les cellules des cultures âgées de 8 heures sont plus sensibles à l'action bactéricide de la pénicilline, et moins sensibles à celle de la streptomycine que des cultures plus âgées.

3° Sauf lorsque les concentrations sont très élevées, l'action bactéricide de la pénicilline, de la streptomycine ou d'un mélange synergique n'est pas immédiate. Elle progresse plus ou moins lentement ; il faut une à quarante-huit heures d'incubation à 37° pour que 99,9 p. 100 de la population soient tués.

4° Des concentrations d'antibiotique faibles proches des concentrations inefficaces, provoquent souvent une phase de dépopulation passagère, suivie d'un accroissement de population. Dans le cas de la streptomycine, il s'agit d'une multiplication secondaire de germes résistants. Dans le cas de la pénicilline, les germes qui se multiplient ne sont pas résistants.

5° A 4°, la pénicilline, la streptomycine et leur mélange manifestent une action bactéricide beaucoup moins forte qu'à 37°.

6° La concentration minima active de streptomycine sur *Staph. pyogenes* W conserve son effet bactéricide malgré une dilution au 1/16 dans du bouillon pur si cette dilution est faite après quatre heures d'incubation à 37°. Elle le perd si on remplace la dilution par l'addition d'un inhibiteur (NaCl, 5,4 p. 100).

7° La concentration minima active de la pénicilline sur *Staph. pyogenes* W conserve son effet bactéricide même après dilution au 1/16 dans du bouillon pur en quelques minutes. Elle le perd, si au lieu de diluer, on ajoute de la pénicillinase, même après vingt-quatre heures d'incubation à 37°.

8° La contradiction n'est qu'apparente : les staphylocoques traités par des doses bactériostatiques de pénicilline ou de streptomycine sont « sensibilisés » à certaines concentrations non inhibitrices de pénicilline ou de streptomycine respectivement.

9° L'effet bactéricide d'un mélange synergique de pénicilline et de streptomycine est annulé par la dilution dans du bouillon pur. Il ne l'est pas par la dilution dans du bouillon contenant de la streptomycine, si la dilution est faite après quatre heures à 37°. Il n'est pas annulé par addition d'un inhibiteur de la streptomycine (NaCl, 5,4 p. 100), après quatre heures à 37°. Mais il l'est par addition de pénicillinase.

9° Le contact de *Staph. pyogenes* W avec de petites doses de pénicilline ou de streptomycine ne le sensibilise pas à des concentrations très faibles de l'autre antibiotique. En d'autres termes, ni l'un ni l'autre ne « préparent » à une action synergique.

10° Il existe des mélanges synergiques de pénicilline et de streptomycine pour des variants de *Staph. pyogenes* W résistants à la streptomycine, aussi bien que pour la souche mère sensible. Ces mélanges contiennent autant de pénicilline, mais plus de streptomycine que le mélange nécessaire pour tuer 99,9 p. 100 de la souche sensible.

SUMMARY.

Penicillin is as bactericidal in a rich as in a poor medium ; streptomycin loses much of its bactericidal power in a rich medium. Young bacteria are more sensitive to penicillin and less sensitive to streptomycin, than older bacteria. The bactericidal action of penicillin, streptomycin or their synergic mixture increases with time of incubation ; it may be very rapid if the concentrations of the antibiotics are high. Concentrations bordering on non-bactericidal concentrations, frequently produce a decrease in the living population, followed by a secondary multiplication of cells ; these cells are resistant to the antibiotic

if streptomycin, but still sensitive if penicillin has been used. Both antibiotics and their synergic mixture are more bactericidal at 37° C than at 4° C.

The bactericidal influence of streptomycin on *Staph. pyogenes* W persists when 15 volumes of broth are added, after 4 hours incubation at 37° C, but not if a concentrated solution of sodium chloride is added. In the case of penicillin, broth may be added within a few minutes, but penicillinase annihilates its bactericidal power even if added after 24 hours. Staphylococci treated with bacteriostatic concentrations of either antibiotic seem to become « sensitized » to sub-inhibitory doses. The bactericidal action of a synergic mixture of penicillin and streptomycin is destroyed by late dilution with pure broth or with penicillinase, but not by dilution after 4 hours incubation with broth containing streptomycin nor by addition of 5,4 p. 100 sodium chloride. Small doses of penicillin do not sensitize staphylococci to the synergic action of streptomycin, nor streptomycin to penicillin. Variants of *Staph. pyogenes* W resistant to streptomycin are killed by synergic mixtures of penicillin and streptomycin, provided more streptomycin is used than for the sensitive parent strain.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 545 ; 1953, **85**, 122.
- [2] EAGLE (H.). *Science*, 1948, **107**, 44.
- [3] EAGLE (H.) et MUSSelman (A. D.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 99.
- [4] GRATIA (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **57**, 552.
- [5] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 266. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 250.
- [6] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1055.
- [7] LINZ (R.) et LECOCQ (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1698.
- [8] MAAS (E. A.) et JOHNSON (M. J.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 415.
- [9] MILLER (J.), ROWLANDS (S.) et LESTER SMITH (E.). *Nature*, 1948, **161**, 1009.
- [10] SCHÖNFELD (J. K.). *Antonie van Leeuwenhoeck*, 1955, **21**, 316.

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES SALMONELLES

III. — HÉMAGGLUTININES ET PRÉCIPITINES DE QUELQUES SÉRUMS ANTI-S. GALLINARUM ET ANTI-S. TYPHI.

par C. DAVARPANAH et A.-M. STAUB (*)

(Institut Pasteur. Service des Vaccins)

Dans un précédent travail [6], nous avons dénombré un certain nombre d'anticorps précipitants ou non (mais coprécipitants), dans 4 sérum anti-*S. gallinarum* et 3 sérum anti-*S. typhi*. Cette étude a été effectuée avec 6 extraits microbiens dont 4 se fixent sur les globules rouges de mouton : les deux polyosides extraits par hydrolyse alcaline (K T et K G), conformément aux résultats antérieurs de Thomas et Mennie [7], confirmés par l'un de nous [5], et les deux antigènes somatiques (B G et B T) conformément aux résultats de Ceppelini et Gregorio [3].

Nous avons recherché dans le présent travail le rôle des divers anticorps dénombrés, précipitants ou non précipitants, dans l'agglutination des globules (1) sensibilisés par les 4 extraits.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

SÉRUMS. — Nous avons utilisé 4 sérum dont la préparation a été décrite dans notre mémoire précédent :

- 1° Le sérum de lapin anti-*S. gallinarum* n° 2 ;
- 2° Le sérum de cheval anti-*S. gallinarum* n° 6 ;
- 3° Le sérum de lapin anti-*S. typhi* n° 4 ;
- 4° Le sérum de cheval anti-*S. typhi* n° 7.

Sérum épuisé par B T (ou les autres extraits) : sérum précipités par la quantité de B T (ou des autres extraits) correspondant au maximum de la courbe de précipitation, établie par l'étude quantitative relatée dans le mémoire précédent [6].

EXTRAITS. — Ce sont ceux que nous avons préparés pour l'étude des précipitines [6], nous les rappellerons pour mémoire :

(*) Manuscrit reçu le 23 avril 1956.

(1) Dans tout ce travail le mot « globules » signifiera toujours « globules rouges de mouton ».

B T = antigène somatique extrait de *S. typhi* par la méthode de Boivin.

B G = même antigène extrait de *S. gallinarum*.

K T = polyoside extrait des germes secs de *S. typhi* par hydrolyse alcaline.

K G = même polyoside extrait des germes secs de *S. gallinarum*.

A T = polyoside extrait par hydrolyse acétique des germes secs de *S. typhi*.

A G = même polyoside extrait des germes secs de *S. gallinarum*.

GLOBULES ROUGES. — Nous avons toujours utilisé les globules rouges de mouton préparés par l'Institut Pasteur dont la conservation est assurée pendant quelque temps au moyen d'un antibiotique.

SENSIBILISATION DES GLOBULES ROUGES. — Après lavage des globules par la solution physiologique (NaCl 0,85 p. 100), les extraits étaient mis en présence d'une suspension de globules à 1 p. 100, à la quantité requise (20 µg pour 1 cm³ de globules à 1 p. 100). Après agitation pendant deux heures à 37° et centrifugation, les globules étaient lavés trois fois par la solution physiologique, puis mis en suspension (1 p. 100) dans la même solution et conservés à +4°.

Nous appellerons « globules K T » les globules sensibilisés avec l'extrait K T ; « globules K G », les globules sensibilisés par l'extrait K G, etc.

HÉMAGGLUTINATION. — On met en présence dans des tubes de Kahn, 0,2 cm³ de sérum et 0,1 cm³ de globules sensibilisés (suspension à 1 p. 100). On laisse une heure au bain-marie à 37° et on lit les résultats après douze à quarante-huit heures au laboratoire. Les tubes agglutinés présentent une pellicule dentelée couvrant le fond du tube, alors que dans les tubes négatifs les globules sont tous rassemblés au centre du fond en un point sombre. Les chiffres donnés sont les inverses de la dernière dilution de sérum donnant une agglutination visible de cette façon.

PRÉCIPITATION. — Epreuve classique du disque ou « ring-test ».

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Avant de procéder à l'étude des sérum entiers et « épuisés » par les divers extraits, nous avons recherché quelle était la quantité de chaque extrait nécessaire et suffisante pour sensi-

biliser les globules rouges de mouton. Le tableau I montre que pour les extraits B T, B G, K G et K T, cette quantité est la même : 20 µg pour 1 cm³ d'une suspension de globules rouges à 1 p. 100. C'est donc cette quantité que nous avons toujours utilisée.

TABLEAU I. — Quantités d'extraits microbiens nécessaires et suffisantes pour sensibiliser 1 cm³ de globules rouges à 1 p. 100.

Extraits de <i>S. gallinarum</i>		
Quantités d'extract utilisées	Titre d'hémagglutination des sérum	
	Cheval n° 6	Lapin n° 2
Polyoside K G		
0,2 µg.	12.000(2)	100
2	51.000	1.600
20	51.000	6.000
200	51.000	6.000
Antigène B G		
0,2 µg.	100	100
2	100	100
20	51.000	3.000
200	51.000	3.000
Extraits de <i>S. typhi</i>		
Quantités d'extract utilisées	Titre d'hémagglutination des sérum	
	Cheval n° 7	Lapin n° 4
Polyoside K T		
20(1) µg.	51.000	3.000
200	51.000	3.000
Antigène B T		
20 µg.	51.000	12.000
200	51.000	6.000

(1) Nous basant sur les résultats de STAUB (5), nous n'avons pas essayé les quantités inférieures.

(2) Inverse du titre d'hémagglutinines.

Quant aux polyosides A T et A G, obtenus par hydrolyse acide des germes secs, ils ne se fixent pas sur les globules, quelles que soient les quantités utilisées (20 à 2 500 µg pour 1 cm³ de globules rouges à 1 p. 100), conformément aux observations des autres auteurs (Bier, Corvazier, Landy [1]).

Les suspensions de globules sensibilisés avec les extraits B G et B T se conservent très mal à la glacière : elles se lysent très vite. Les suspensions de globules sensibilisés avec les extraits K G et K T se conservent mieux. Néanmoins, nous avons toujours travaillé avec des suspensions vieilles au plus de quarante-huit

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES SALMONELLES 567

heures. Dans ces conditions le titre hémagglutinant des sérum étudiés est resté constant d'une expérience à l'autre.

TABLEAU II. — Anticorps précipitants et anticorps hémagglutinants dans les sérums épuisés par divers extraits.

S E R U M S		Etude des surnageants avec							
n°	épuisé par	K G P (1)	Hém. Hém. (2)	K T P Hém.	B G P Hém.	B T P Hém.			
<u>anti-S. gallinarum</u>									
Lapin 2	néant	+	3.000	+	1.600	+	6.000	+	1.600
	A T	+	800	-	100	+	1.600	-	100
	K T	+	1.600	-	-	+	1.600	-	-
	A G	-	100	-	-	+	400	+	-
	K G	-	100	-	-	+	400	+	-
	B T	-	400	-	-	+	800	-	-
	B G	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval 6	néant	+	50.000	+	50.000	+	50.000	+	50.000
	A T	+	3.000	+	100	+	3.000	+	100
	K T	+	1.600	-	-	+	1.600	+	-
	A G	-	100	-	-	+	400	+	-
	K G	-	-	-	-	+	400	+	-
	B T	-	200	-	-	+	1.600	-	-
	B G	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>anti-S. typhi</u>									
Lapin 4	néant	+	800	+	3.000	+	6.000	+	6.000
	A G	-	400	+	3.000	+	3.000	+	3.000
	K G	-	400	+	3.000	+	3.000	+	3.000
	A T	-	400	-	800	+	800	+	800
	K T	-	-	-	200	+	400	+	00
	B G	-	-	+	800	-	800	+	800
	B T	-	-	-	-	-	-	-	-
Cheval 7	néant	+	50.000	+	50.000	+	50.000	+	50.000
	A G	+	3.000	+	12.000	+	800	+	12.000
	K G	-	200	+	3.000	+	400	+	6.000
	A T	+	3.000	+	1.600	+	800	+	1.600
	K T	-	200	-	100	+	400	+	200
	B G	-	-	+	3.000	-	-	+	3.000
	B T	-	-	-	-	-	400	-	-

(1) P = épreuve du disque (« ring-test »).

(2) Hém. = inverse du titre de la dernière dilution de sérum capable d'agglutiner les globules sensibilisés avec l'extrait correspondant.

— = <100.

Erratum. — Sérum lapin n° 2 épuisé par AT et KT : lire + au lieu de — dans la colonne P de BT.

Nous avons recherché le pouvoir hémagglutinant ainsi que le pouvoir précipitant de chacun des 4 sérums, entier ou épuisé par chacun des 6 extraits. Le tableau II résume nos résultats.

On voit que dans certains cas il y a concordance entre les résultats de la précipitation d'un extrait et de l'agglutination des globules rouges sensibilisés avec le même extrait. C'est ce qu'on observe avec les « globules B G » et les deux sérum anti-*S. gallinarum*, ainsi qu'avec les « globules B T » et les deux sérum anti-*S. typhi*. Les sérum anti-*S. gallinarum* « épuisés » par chacun des extraits, sauf B G, sont encore précipités par B G et agglutinent les globules B G. De même les sérum anti-*S. typhi* épuisés par chacun des extraits, sauf B T, sont encore précipités par B T et agglutinent les globules B T.

Par contre, dans tous les autres cas, il n'y a pas concordance absolue entre les résultats de l'hémagglutination et ceux de la précipitation. Certains sérum « épuisés » qui ne précipitent plus avec un extrait sont encore capables d'agglutiner les globules sensibilisés avec le même extrait. Le titre en hémagglutinines de ces sérum épuisés est généralement faible (100-200), mais il peut s'élever dans certains cas jusqu'à 400 (globules K G avec le sérum n° 2 épuisé par B T et sérum n° 3 épuisé par A G, K G ou A T), et même 800 (globules B G et sérum n° 4 épuisé par B G ; globules K T et sérum n° 4 épuisé avec A T).

Généralement les sérum qui contiennent encore des anticorps capables de précipiter un extrait sont aussi capables d'agglutiner les globules sensibilisés avec cet extrait. Néanmoins, ceci n'est pas le cas pour l'extrait B T et les sérum anti-*S. gallinarum* épuisés par les extraits K T, A G et K G.

Nous allons tenter d'expliquer ces discordances dans la discussion qui suit.

DISCUSSION.

ANTICORPS NON PRÉCIPITANTS ET HÉMAGGLUTINANTS. — Le fait que des sérum ne précipitant pas un antigène (ou haptène) sont pourtant capables d'agglutiner les globules chargés avec cet antigène a été souligné dès les premières applications de la méthode d'hémagglutination conditionnée : soit qu'il s'agisse d'anticorps en trop faible quantité pour être décelés par la précipitation beaucoup moins sensible que l'hémagglutination [4], soit qu'il s'agisse d'anticorps non précipitants, soit qu'il s'agisse encore de complexes antigène-anticorps solubles, présents dans le sérum après précipitation par l'antigène et dissociés en présence de l'antigène fixé sur les globules rouges [2].

L'un de nous avait déjà montré [5] qu'en précipitant un sérum anti-*S. typhi* par le polyoside K T, on laissait toujours des anticorps décelables par l'hémagglutination des globules K T. Nous retrouvons ce phénomène avec les deux sérum anti-*S. typhi* ainsi qu'avec l'un des sérum anti-*S. gallinarum* (n° 2) et le polyoside K G.

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES SALMONELLES 569

Nous allons tenter d'expliquer l'hémagglutination des globules sensibilisés avec un extrait ne précipitant pas le serum, au moyen des anticorps non précipitants et coprécipitants décelés lors de l'analyse de nos sérums relatée dans le premier mémoire et dont nous reproduisons le schéma final.

Pour le serum n° 4, qui contient les anticorps 3 sous forme d'anticorps non précipitants mais coprécipitants, on peut très

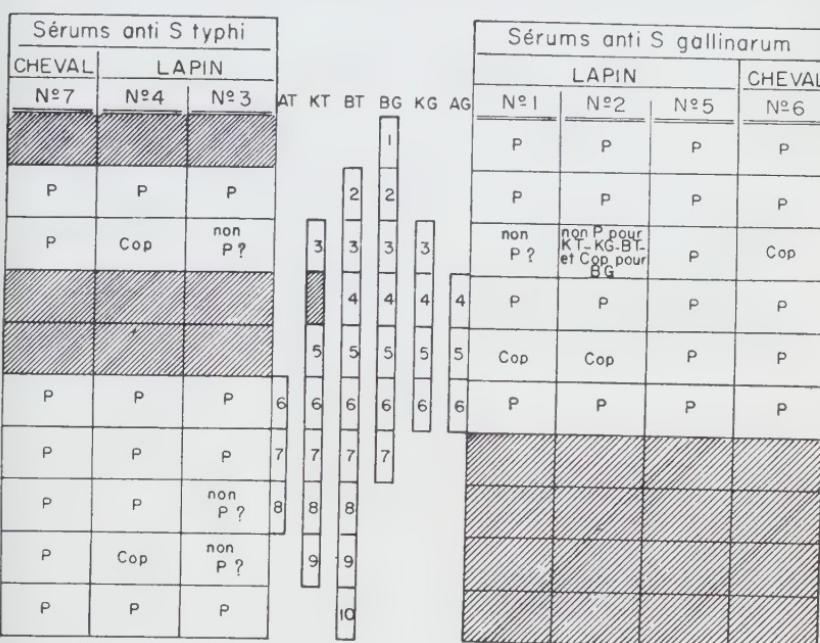


FIG. 1. — Motifs antigéniques trouvés dans les 6 extraits et caractères des anticorps correspondants.

Les anticorps 1,4 et 5 se trouvent seulement dans les sérums anti-S. *gallinarum*. Les anticorps 7, 8, 9 et 10 se trouvent seulement dans les sérums anti-S. *typhi*.

P = précipitant.

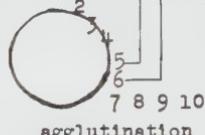
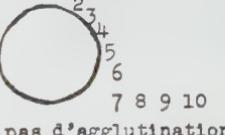
Cop = coprécipitant.

non P = non précipitant.

bien concevoir qu'une partie seulement de ces anticorps 3 soit entraînée au cours de la précipitation du serum par K G, et que les anticorps 3 restant dans le serum « épuisé » par K G soient responsables de l'agglutination, par ce serum, des globules K G. Ces mêmes anticorps 3, qui restent dans le serum après « épuisement » par A G ou A T, seraient responsables de l'agglutination des globules K G par les surnageants de ces précipitations.

L'agglutination des globules K T par le même sérum n° 4 épuisé par K T ne peut être due à la présence des anticorps 3, puisque l'absence d'agglutination des globules K G montre que ces anticorps ont tous été entraînés au cours de la précipitation du sérum par K T. Elle serait due à la présence des anticorps coprécipitants.

TABLEAU III. — Représentation schématique de la fixation de l'antigène B T sur les globules rouges de mouton.

	Anticorps du sérum anti-S. gallinarum total 1 2 3 4 5 6	Anticorps restant dans le sérum anti-S. gallinarum épuisé par AG 1 2 3
Motifs antigéniques de B T en solution	2 3 4 5 6 précipitation	2 3 4 5 6 précipitation
Motifs antigéniques de B T fixé sur les globules rouges	 agglutination	 pas d'agglutination

1, 2 6 : motifs antigéniques dénombrés dans l'antigène B T, au cours d'une étude antérieure (6) schématisés sur la figure 1.

pitants 9 incomplètement précipités. L'agglutination des mêmes globules K T par le sérum n° 4 épuisé par A T ne peut être due aux anticorps 3, comme nous le verrons dans la deuxième partie de cette discussion ; elle serait due à la présence des anticorps 9 non précipitants.

Les anticorps 3 non précipitants mais coprécipitants du sérum n° 6 peuvent être responsables de l'agglutination des « globules K G » par le sérum épuisé par A G.

Pour les sérums n° 2 et n° 7, l'étude des courbes de précipitation n'a pas permis de mettre en évidence des anticorps non précipitants et coprécipitants. Mais rien n'empêche de penser que dans le premier sérum ces anticorps sont en trop petit nombre pour être détectables et que dans le deuxième leur présence est masquée par celle des anticorps 3 précipitants.

En effet, la présence des anticorps 3 non précipitants (mais coprécipitants) est révélée par le fait qu'un sérum épuisé par A G ne précipite plus par K G, bien que K G précipite plus d'anticorps que A G au sommet de la courbe de précipitation. Si les anticorps 3 sont constitués par un mélange d'anticorps précipi-

tants et non précipitants, le serum « épuisé » par A G sera précipité par K G et nous ne pourrons pas déceler la présence des anticorps non précipitants.

Ce seraient donc encore les anticorps 3 qui seraient responsables de l'agglutination des « globules K G » par le serum n° 2 épuisé par A G et K G et le serum n° 7 épuisé par K G et K T.

Pour les globules K T agglutinés par le serum n° 7 épuisé par K T, nous verrons dans la seconde partie de cette discussion qu'il ne peut s'agir des anticorps 3 ; peut-être s'agit-il d'anticorps 9 coprécipitants masqués par la présence des anticorps précipitants.

L'hémagglutination des globules K G par les sérum anti-*S. gallinarum* « épuisés » par B T reflète le fait, signalé dans notre premier mémoire, que cet épuisement était incomplet. La complexité de l'antigène somatique ne permet pas de précipiter tous les anticorps correspondants, certains antigènes du mélange qui constitue B T étant déjà dans la zone d'excès d'antigène (où se forment des complexes solubles antigène-anticorps) au moment où d'autres sont au maximum de la courbe de précipitation. Ce sont ces complexes solubles qui se dissocient en présence de K G fixé sur les « globules K G » et les agglutinent.

Le même raisonnement vaut pour l'agglutination de B G par le serum anti-*S. typhi* n° 3 par les « globules B G ».

Enfin l'agglutination des « globules B G » par le serum n° 7 épuisé par B T qui n'agglutine plus les globules B T ne pourra s'expliquer qu'après avoir abordé la deuxième partie de cette discussion, portant sur l'impossibilité d'agglutiner certains globules sensibilisés, par des anticorps capables de précipiter l'extrait sensibilisant.

ANTICORPS PRÉCIPITANTS NON HÉMAGGLUTINANTS. — L'examen du tableau I met tout de suite en lumière le fait assez paradoxal suivant : les deux sérum anti-*S. gallinarum* épuisés par K T, A G et K G, qui sont encore précipités par B T n'agglutinent plus les « globules B T ». En se rapportant à la figure 1 on voit que tout se passe comme si les motifs antigéniques 2, 3 et 4 de B T, correspondant aux anticorps responsables de la précipitation par B T du serum épuisé par A G (anticorps 2 et 3), par K G (anticorps 2) et par K T (anticorps 2 et 4), étaient inaccessibles aux anticorps après fixation de B T sur les globules rouges. C'est ce que schématisent les figures du tableau III.

L'inaccessibilité des « antigènes 3 » sur les globules K T et B T explique le fait que les sérum n°s 2 et 6 épuisés par A G et K G, qui agglutinent les « globules K G », sont sans action sur les globules K T. Elle rend de même peu vraisemblable le rôle des anticorps 3 dans l'agglutination des « globules K T ».

par les sérum anti-*S. typhi* n° 4 et 7 épuisés par A T et K T. Il doit s'agir dans ce cas des seuls anticorps 9, comme nous l'avons dit plus haut.

Reste enfin le cas des globules B G agglutinés par le sérum n° 7 épuisé par B T, que nous avons renvoyé à la fin de cette discussion. Il s'agit d'un sérum anti-*S. typhi* qui, après « épuisement » par B T, n'est plus précipité ni par B T ni par B G (ce qui est normal puisque dans ce sérum il n'existe pas d'anticorps 1 propres à *S. gallinarum*) et n'agglutine plus les globules B T, mais agglutine encore les globules B G. Nous avons déjà souligné l'hétérogénéité de B T et l'impossibilité de précipiter avec cet antigène tous les anticorps homologues présents dans les sérum anti-*S. gallinarum*. Il se peut qu'il en soit de même avec le sérum anti-*S. typhi* n° 7, mais que les complexes antigène-anticorps qui restent en solution au sommet de la courbe de précipitation ne contiennent que des anticorps 2, incapables d'agglutiner les globules K G, K T et B T, et capables d'agglutiner les globules B G.

Au terme de cette discussion nous ferons deux remarques :

1° Contrairement à l'opinion généralement admise, la technique d'hémagglutination passive ne permet pas toujours de déceler des anticorps même abondants (le sérum n° 2 épuisé par K T contient 82 µg d'azote précipitable par B T, d'après le tableau I de notre premier mémoire). Néanmoins, ceci n'a été observé qu'avec des réactions croisées : extrait de *S. typhi* et sérum anti-*S. gallinarum*, cas peu fréquent dans les applications courantes de l'hémagglutination passive.

2° Les mêmes motifs antigéniques 2, 3 et 4 doivent se trouver différemment situés sur les molécules de B G et de B T, puisque, lorsque ces deux extraits sont fixés sur les globules rouges, ils sont accessibles aux anticorps dans le cas de B G et inaccessibles dans le cas de B T.

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié systématiquement deux sérum anti-*S. typhi* et deux sérum anti-*S. gallinarum* « épuisés » par 6 extraits, préparés à partir de ces deux salmonelles, au moyen de l'hémagglutination des globules de mouton sensibilisés avec 4 de ces extraits. En comparant les résultats obtenus avec ceux de la précipitation qualitative (épreuve du disque ou « ring-test »), on constate qu'il y a parfois concordance, mais très souvent discordance entre les deux techniques.

De nombreux sérum « épuisés » qui ne précipitent pas certains extraits, agglutinent quand même les globules sensibilisés avec ces extraits : ceci peut s'expliquer dans certains cas par la

présence d'anticorps non précipitants (mais coprécipitants), et dans d'autres cas par la présence de complexes solubles antigène-anticorps dans la zone d'excès d'antigène.

Les deux sérum anti-*S. gallinarum* épuisés par certains extraits n'agglutinent pas les globules sensibilisés avec B T (antigène somatique typhique), bien qu'ils soient encore précipités par l'extrait B T. Certains motifs antigéniques de B T doivent donc être devenus inaccessibles aux anticorps par suite de la fixation de l'antigène sur les globules ; ces mêmes motifs sont aussi inaccessibles aux anticorps lors de la fixation du polyoside K T sur les globules. Les anticorps correspondants ne jouent donc aucun rôle dans l'agglutination des globules sensibilisés avec ces extraits, alors qu'ils agglutinent les globules sensibilisés avec les mêmes extraits préparés à partir de *S. gallinarum* qui contiennent les mêmes motifs antigéniques.

SUMMARY.

The authors have studied the agglutination of sheep erythrocytes (S. R. C.) sensitized by 4 *Salmonella* polysaccharides, by 2 anti-*S. typhi* and 2 anti-*S. gallinarum* sera and by the same sera saturated with *Salmonella* extracts.

The results obtained compared to the precipitation of the sera by the sensitizing extracts, showed that the two techniques sometimes agree but very often do not agree.

Very often saturated sera which do not precipitate an extract do agglutinate the S.R. C. sensitized with the same extract. A fact which can be explained by the presence of non precipitating antibodies or soluble complexes antigen-antibody in the antigen excess zone.

It may also happen that saturated sera which precipitate an extract do not agglutinate the S. R. C. sensitized with this extract, a fact which shows that some antigenic patterns of the extract are blocked on the cell and are no longer available for the antibodies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BIER (O.), CORVAZIER (P.) et LANDY (M.), in GRABAR (P.). *J. méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 323.
- [2] BORDUAS (A. G.) et GRABAR (M. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 903.
- [3] CEPELLINI (R.) et GREGORIO (M. DE). *Boll. Ist. sier. milan.*, 1953, **32**, 429.
- [4] GRABAR (P.). *Actes du VI^e Congrès Microb.*, Rome, 1953, vol. II, p. 169.
- [5] STAUB (A. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **80**, 21.
- [6] STAUB (A. M.) et DAVARPAHAN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **94**, 338.
- [7] THOMAS (J. C.) et MENNIE (A. T.). *Lancet*, 1950, **259**, 745.

**SUR LES LEVURES
DÉNOMMÉES *SACCHAROMYCES STEINERI*
ET *SACCHAROMYCES ITALICUS***

par E. PEYNAUD et Mlle S. DOMERCQ (*)

(Station agronomique et œnologique de Bordeaux)

1^o En 1924, Steiner décrit dans sa thèse une levure isolée d'un moût de raisin provenant de la région de Johannisberg, dans le Valais suisse. Faisant fermenter le glucose, le maltose, difficilement le galactose, elle est sans action sur le saccharose. Steiner fait le rapprochement entre cette levure et *Saccharomyces rouxii* Boutroux ; elle en diffère cependant par des cellules plus grandes et par le nombre des ascospores allant jusqu'à 4 par asque, alors que *Saccharomyces rouxii* en produit au maximum 3. Ne pouvant identifier cette levure à une espèce déjà connue, Steiner l'a nommée *Saccharomyces chodati*.

Stelling-Dekker en 1931, puis Lodder et Kreger-Van Rij en 1952 ont étudié la souche originale isolée par Steiner. Ces derniers auteurs la désignent sous le nom de *Saccharomyces steineri*, la dénomination *Saccharomyces chodati* ayant été déjà donnée en 1921 par Schweizer à une levure isolée de cerises en fermentation.

On peut grouper de la façon suivante les observations faites jusqu'à maintenant en ce qui concerne les tests de fermentation des sucres par cette levure (tableau I).

On peut remarquer que ces observations, effectuées pourtant sur la même souche, varient pour la fermentation du saccharose. Elle est nulle d'après Steiner, lente d'après Stelling-Dekker, tandis que Lodder et K. Van Rij estiment que cette levure fait très bien fermenter ce sucre.

2^o En 1938, Castelli isole à la fin de la fermentation d'un moût de raisin provenant de Castellina (Chianti), une souche d'une nouvelle espèce qu'il nomme *Saccharomyces italicus*. Il donne les caractéristiques suivantes concernant la fermentation des sucres :

Glucose +; galactose +; saccharose —; maltose +; lactose —; raffinose —.

(*) Manuscrit reçu le 5 mai 1956.

C'est-à-dire pratiquement les mêmes observations que Steiner avait faites sur sa souche de *Saccharomyces chodati*. Castelli compare également la levure qu'il a isolée avec *Saccharomyces rouxii*; ici encore *Saccharomyces italicus* s'en distingue par des

TABLEAU I.

	STEINER	STELLING-DEKKER	LODDER et K-VAN RIJ
Glucose	+	+	+
Galactose	+ (faible)	+	+
Saccharose	-	+ (très)	+
Maltose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Raffinose	-	-	-

cellules plus grandes et plus allongées et forme jusqu'à 4 spores, au lieu de 3.

3° Reprenant l'étude de cette même souche, Lodder et K. Van Rij trouvent une fermentation du saccharose légèrement positive, bien que très faible et après un long temps d'incubation. D'après

TABLEAU II.

		<u>Saccharomyces steineri</u>	<u>Saccharomyces italicus</u>
Culture sur extrait de malt	Forme Dimensions	Ovale à ovale allongé (4-8) x (5-15) μ	Ovale à ovale allongé (3-8) x (5-14) μ
Culture sur malt gélosé	Forme Dimensions	Ovale à ovale allongé (3-6) x (6-12) μ	Ovale à ovale allongé (2,5-6) x (5-15) μ
Culture en strie	Aspect	Jaune brun, molle, légèrement pointillée(?)	Blanc jaune, molle, lisse et brillante.
Culture en lame		Pseudomycélium primitif	Pseudomycélium primitif
Sporulation		1 à 4 spores rondes	1 à 4 spores rondes
Assimilation des nitrates		Nulle	Nulle
Développement sur éthanol		Pas de croissance	Pas de croissance
Scission de l'arbutine		Nulle	Nulle

la description de ces auteurs, la différence entre *Saccharomyces steineri* et *Saccharomyces italicus* est donc très peu marquée : elle ne porte que sur un degré légèrement différent de fermentation du saccharose et encore a-t-on vu que tous les auteurs

ne sont pas en parfait accord à ce sujet. D'autre part, ces deux levures ne se différencient par aucun caractère morphologique, ainsi que le montre le tableau II, qui rapproche les descriptions données par Lodder et K. Van Rij (pages 218 et 211).

4° Il est aisé de montrer qu'il s'agit en réalité de la même espèce de levure, la fermentation du saccharose, c'est-à-dire la production d'invertase, variant pour certaines souches suivant les conditions de culture.

Nous avons eu à notre disposition les souches authentiques qui nous ont été fournies par le Centraalbureau voor Schimmelcultures (C B S) de Delft. Parallèlement, nous avons étudié une série de 19 levures appartenant à cette espèce, isolées de moûts de raisins de la Gironde. C'est précisément à la suite des difficultés rencontrées dans la classification de ces levures entre les espèces *Saccharomyces steineri* et *Saccharomyces italicus* qu'a été entreprise cette étude détaillée. Les caractères morphologiques que nous avons notés confirmont les observations du tableau II.

5° Nous avons mesuré pour ces différentes levures la durée de la phase de latence dans la fermentation du saccharose, par la technique classique des tubes équipés de clochettes de Durham. Le milieu utilisé dans ces premiers essais est à base d'extrait de levure ; il est constitué de 4/5 du volume d'une solution à 7,5 g d'extrait de levure commercial par litre et de 1/5 d'une solution de saccharose à 10 p. 100, soit 2 p. 100 de sucre pour le milieu de culture définitif. Nous avons également utilisé l'eau de levure préparée directement à partir de levure de boulangerie (200 g pour 1 l). Il est à remarquer que Castelli employait pour le même essai un milieu à base d'extrait de viande et de peptone. Voici pour quelques souches les délais nécessaires à l'apparition d'une bulle de gaz carbonique, indiquant le début de la fermentation du saccharose, les tubes étant placés à l'étuve à 25° C. Ces essais ont été refaits à plusieurs reprises.

	PHASE DE LATENCE
<i>Saccharomyces steineri</i> (souche C B S)	2 jours
Cadillac, n° 1	3 "
Cadillac, n° 2	6 "
Romagne .. .	8 "
Castres .. .	11 "
Barsac .. .	15 "
<i>Saccharomyces italicus</i> (souche C B S)	15 "

Toutes les souches essayées fermentent le saccharose, mais après des temps d'incubation très variables allant de deux à quinze jours, avec tous les intermédiaires. On ne peut donc classer sûrement sur cette base les levures étudiées dans l'espèce *steineri* ou dans l'espèce *italicus* ; il serait arbitraire de limiter l'examen

de l'essai de fermentation à huit jours par exemple, le test pouvant être positif quelques jours plus tard. Nous avions déjà souligné que si l'on peut baser une classification physiologique des levures sur la présence ou l'absence d'un certain enzyme, ici l'invertase, il est impossible d'envisager une classification reposant sur le taux de cet enzyme, car ce taux est également fonction du milieu et des conditions de travail de la levure.

6° Nous avons refait le test de fermentation du saccharose, toujours d'après la technique de Durham, mais en utilisant, à la place du milieu à l'eau de levure, un milieu synthétique tamponné à pH 7, contenant les sels minéraux nécessaires sous forme de cendres de levure, l'azote sous forme de sels d'ammonium et d'asparagine, et tous les facteurs de croissance aux doses optimums. Ces essais sont reproduits en plusieurs exemplaires, avec des inoculum d'âges divers, le plus ancien n'ayant pas été repiqué depuis sept mois, pour voir l'influence possible du vieillissement des cellules.

On s'aperçoit alors que la fermentation du saccharose se déclare pour toutes les souches, y compris *Saccharomyces italicus* C B S, en deux ou trois jours. Dans ces conditions, toutes se comportent exactement de la même façon. Le milieu joue donc un rôle considérable dans la biosynthèse de l'invertase ; sur eau de levure la production d'invertase est très faible pour certaines souches, tandis qu'elle est bonne sur milieu synthétique complet. Depuis longtemps Fernbach avait montré que la nature de l'aliment azoté offert à la levure influe sur la production d'invertase et que précisément l'eau de levure est pour certaines souches un milieu peu favorable à la production diastasique. D'autre part, base d'un bon milieu de culture, lorsqu'elle est diluée, l'eau de levure trop concentrée gêne la croissance des levures, ainsi que Suzanne Lafourcade l'a remarqué.

7° Les observations précédentes concernaient la phase de latence. Nous avons établi par pesées les courbes de fermentation du saccharose avec ces deux levures, parallèlement en solution synthétique et dans l'eau de levure. Nous donnons ci-dessous le sucre fermenté en grammes, en fonction du temps.

Il se confirme que le milieu synthétique complet est plus apte à entretenir la fermentation du saccharose que l'eau de levure. Dans ces dernières conditions le départ a été effectivement plus lent avec *Saccharomyces italicus*, mais par la suite la fermentation s'est même déroulée plus vite pour cette levure que pour *Saccharomyces steineri*. Malgré tout, la fermentation du saccharose reste relativement lente pour les deux levures.

En résumé, la seule différence qui existe entre les souches authentiques de *Saccharomyces italicus* et de *Saccharomyces steineri* tient à la difficulté qu'a *Saccharomyces italicus* de faire

démarrer la fermentation du saccharose dans l'eau de levure. Cette distinction n'est pas absolue car il y a des souches intermédiaires ; elle n'est pas définitive, car une fois amorcée, la fermentation se déroule à la même vitesse pour les deux levures.

8° Des mesures comparatives plus précises de l'intensité fermentative de ces levures ont été faites par la technique manométrique avec l'appareil de Warburg par Madeleine Lafon. On

TABLEAU III.

		7 jours	20 jours	45 jours
Eau de levure	<u>Saccharomyces steineri</u>	16	59	104
	<u>Saccharomyces italicus</u>	6	36	115
Milieu synthétique	<u>Saccharomyces steineri</u>	23	111	214
	<u>Saccharomyces italicus</u>	72	165	248

opère avec des cellules de deux jours, cultivées parallèlement sur trois milieux : moût de raisin, eau de levure et milieu synthétique complet à 100 g de glucose par litre. Les mesures sont effectuées en solution de saccharose à 50 g par litre, tamponnées à deux pH : 4,8 et 7,0. On obtient les valeurs suivantes de Q_{CO_2} (millimètres cubes de gaz carbonique dégagé par heure par milligramme de poids sec de levure) [tableau IV].

TABLEAU IV.

Milieu de culture	pH des mesures	<u>Saccharomyces steineri</u>	<u>Saccharomyces italicus</u>
Moût de raisin	4,8	11,6	7,7
	7,0	12,7	14,5
Eau de levure	4,8	8,9	11,9
	7,0	12,7	13,2
Milieu synthétique	7,0	15,5	13,7

Les intensités fermentatives sont donc pratiquement identiques. Elles sont relativement faibles par rapport aux mesures effectuées sur glucose, qui ont donné respectivement 246 et 225. Ces levures font fermenter le glucose vingt fois plus vite que le saccharose. Nous pensons cependant que la meilleure preuve que les cellules de *Saccharomyces italicus* peuvent faire fermenter instantanément le saccharose réside dans ces chiffres obtenus avec l'appareil de Warburg.

9° Il n'a pu être observé aucune autre différence fondamentale dans le comportement physiologique de ces levures. Leurs besoins

en facteurs de croissance sont absolument identiques : comme pour la plupart des *Saccharomyces* d'ailleurs, l'acide pantothenique est le facteur le plus important pour la rapidité de leur croissance et la carence en biotine limite les populations finales.

Les pouvoirs alcoogènes ne varient pas plus entre les souches de *Saccharomyces italicus* et de *Saccharomyces steineri* du C B S, qu'entre deux souches quelconques d'une même espèce de *Saccharomyces*. Il en est de même pour la formation des autres produits de la fermentation, comme le montre le tableau V ; les produits secondaires sont exprimés en millimolécules par litre.

TABLEAU V.

	Degré alcoolique	Glycé- rol	Acide acétique	Acide succini- que	2,3 bu- tane- diol	Ethanal
<i>Saccharomyces steineri</i> (CBS)	11°8	74	12,4	8,5	10,6	1,4
<i>Saccharomyces italicus</i> (CBS)	14°1	90	8,8	8,6	6,1	1,2
Souche de Pauillac n°†	13°1	86	16,3	9,8	7,8	1,5
Souche de Pauillac n°2	12°3	78	15,1	9,2	8,3	0,8

10° Nous pensons avoir montré que *Saccharomyces steineri* et *Saccharomyces italicus* ne font qu'une seule et même espèce. Morphologiquement identiques, les descriptions de la bibliographie se superposent exactement. Certaines souches peuvent présenter dans le milieu à l'eau de levure une phase de latence plus prolongée dans la fermentation du saccharose. Ce substrat doit être remplacé dans ce test par des milieux nutritifs mieux adaptés et plus complets. Des mesures précises de vitesse de fermentation du saccharose et d'intensité fermentative faites à l'appareil de Warburg montrent bien que ces souches sont capables de faire fermenter le saccharose, quoique beaucoup plus lentement que le glucose. En conséquence, nous conserverons le nom de *Saccharomyces steineri* Lodder et K. Van Rij pour désigner cette espèce de *Saccharomyces* et considérerons *Saccharomyces italicus* comme un synonyme.

SUMMARY.

The authors demonstrate that *Saccharomyces steineri* and *Saccharomyces italicus* belong to the same species. The morphology of these yeasts is identical and the descriptions of previous authors coincide. Certain strains may have a longer latent phase in the fermentation of saccharose when they develop in a yeast-water medium, which should then be replaced by better adapted and more complete media. Accurate measurements of fermentation rate and intensity (in the Warburg apparatus) demonstrate

that these strains are able to attack saccharose, although much more slowly than glucose. The authors think that the name of *Saccharomyces steineri* should be used for this species and that *Saccharomyces italicus* must be considered as a synonym of the former.

BIBLIOGRAPHIE

- CASTELLI (T.). *Archiv. Mikrob.*, 1938, **9**, 449.
- DOMERCQ (S.). *Etude et classification des levures de vin de la Gironde*. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1956.
- FERNBACH (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1890, **4**, 641.
- LAFOURCADE (S.). *Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin*. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1954, p. 14. *Ann. Technol. agric.*, 1954, **3**, 289.
- LODDER (J.) et KREGER-VAN RIJ (N. J. W.). *The yeasts*. North Holland Publish. Company, Amsterdam, 1952.
- PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). *Ann. Technol. agric.*, 1953, **4**, 265. *X^e Congrès international des industries agricoles et alimentaires*, Madrid, 1954. *C. R. Acad. Agric.*, 1955, **41**, 103.
- STEINER (J. M.). *Etude sur les levures actives des vins valaisans*. Thèse Doctorat ès sciences, Genève, 1924.
- STELLING-DEKKER (N. M.). *Die sporogenen Hefen*, Amsterdam, 1931.
- SCHWEIZER (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1921, **35**, 820.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 5 Juillet 1956

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.

COMMUNICATIONS

**SUR UNE VARIÉTÉ DE *CLOACA CLOACAE* (JORDAN)
AEROBACTER CLOACAE BERGEY ET ALIA
TROUVÉE DANS LES BULLES INTACTES D'UNE MALADIE
PEMPHIGOÏDE A ÉVOLUTION CHRONIQUE :
CLOACA CLOACAE VAR. *MAROCANA* v. n.
QUELQUES CONSIDÉRATIONS
SUR LE GENRE *CLOACA* CAST. ET CHALM.**

par ALDO CASTELLANI.

(*Institut de Médecine Tropicale, Lisbonne*)

Dans deux cas d'une maladie à type de pemphigus chronique contractée au Maroc (la description clinique en sera donnée prochainement dans un journal de dermatologie), j'ai trouvé dans les bulles intactes une bactérie qui était présente en culture pure et dont je donne ici une brève description.

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU MICROORGANISME. — Le microorganisme est un bâtonnet mobile, droit ou quelquefois un peu recourbé, de longueur variable de 0,5 à 1-2 μ et plus, sur environ 0,04 à 0,08 μ de large. Il est asporogène et jamais capsulé. Il se développe bien sur tous les milieux de culture en aérobiose et anaérobiose. Il est Gram-négatif et n'est pas acido-résistant.

CULTURES. — *Gélose simple.* — Bon développement. Colonies non pigmentées, jamais mucoïdes. On ne remarque pas d'« envahissement » comme pour les *Proteus*.

Gélose glucosée. — Développement très abondant, colonies blanches. Le milieu est souvent fracturé par des bulles de gaz.

Gélatine. — Lente liquéfaction, bien évidente après le dixième jour, absence de toute odeur fécale.

Sérum coagulé. — Liquéfaction très lente ; quelquefois absente après trente jours d'observation. Pas d'odeur notable.

Pomme de terre. — Bon développement. Colonies blanches.

Milieu de Mac Conkey. — Colonies rouges (le microorganisme produit la fermentation du lactose).

Bouillon. — Développement abondant, turbidité diffuse.

Eau peptonée. — Même caractère, mais développement moins riche.

Lait tournesolé. — Acidité et coagulation. Pas de peptonisation.

Citrate. — Positif.

Rouge méthyl. — Négatif.

Voges-Proskauer. — Négatif.

Odeur fécale. — Absente dans toutes les cultures.

Action fermentative. — Acidité et gaz sur glucose, lévulose, lactose, maltose, saccharose, mannitol, arabinose, galactose, raffinose. Aucune fermentation (ni acidité, ni gaz) en glycérine, dulcitol, érythrytol, inuline.

VIRULENCE. — Récemment isolé le microorganisme inoculé par voie intrapéritonéale, intraveineuse et quelquefois aussi sous-cutanée, tue rapidement le lapin et le cobaye. La virulence est perdue dans les vieilles cultures.

POUVOIR PATHOGÈNE POUR L'HOMME. — Dans les deux cas que j'ai mentionnés le microorganisme était le seul germe présent dans les bulles intactes. S'agissant d'un microorganisme qui peut être la cause d'une maladie grave, je n'ai pas essayé de trouver des volontaires et je regrette de n'avoir pas eu à ma disposition des singes anthropoïdes. La maladie ressemble un peu au *pemphigus septicus* ; mais au lieu d'une évolution rapide il y a évolution chronique, durant des années, comme dans le *pemphigus vulgaris*, quoique l'affection ne semble pas être mortelle. Les bulles sont de grandes dimensions comme dans le *pemphigus vulgaris*. Il y a des accès de fièvre de temps en temps, mais la santé générale n'est pas trop atteinte. Cette affection est certainement différente du vrai *pemphigus vulgaris* et des formes usuelles de *pemphigus septicus*.

SÉROLOGIE. — Il y a agglutination croisée complète entre la souche que j'ai isolée du premier cas et la souche que j'ai isolée du deuxième cas. Il n'y a pas agglutination croisée avec une souche de *Cloaca cloacae* typique que je possède dans mon laboratoire depuis plusieurs années, ni avec une souche nommée *levans*, qui est identique sérologiquement avec celle typique et aussi culturellement (à l'exception du saccharose, qui n'est pas fermenté).

En résumé, le microorganisme que j'ai isolé, est un bâtonnet mobile, anaérobiose facultatif, non-sporogène, toujours non-capsulé, Gram-négatif, qui se développe bien sur tous les milieux usuels. Sur les milieux gélosés il ne présente pas le phénomène d'« envahissement ». Les colonies ont une coloration blanche, elles ne sont pas mucoïdes. Il rend acide et coagule le lait, mais il n'y a pas de peptonisation. Il attaque

avec production de gaz et d'acidité le glucose, le lactose et plusieurs autres sucres et alcools mais pas la glycérine, dans laquelle il ne produit même pas d'acidité. Les cultures n'ont jamais d'odeur fécale.

Mes deux souches, celle isolée du premier cas et celle isolée du deuxième cas, sont identiques par leurs caractères culturels et sérologiques ; elles diffèrent de *Cloaca cloacae* par l'absence de l'odeur fécale, la coloration blanche et non pas jaunâtre des colonies sur pomme de terre, l'absence de peptonisation du lait, l'absence de fermentation acide de la glycérine et la négativité de la réaction Voges-Proskauer. Par les mêmes caractères elles diffèrent de la souche *levans*, qui est culturellement et sérologiquement identique à *Cloaca cloacae*, sauf qu'elles ne fermentent pas le saccharose. Il me semble justifié de créer une nouvelle variété, pour laquelle je propose l'appellation *marocana*. L'appellation complète du microorganisme sera *Claca cloacae* (Jordan, 1890) var. *marocana* Cast. 1956.

★ ★

CONSIDÉRATIONS SUR LE GENRE *Cloaca* CASTELLANI ET CHALMERS 1919. — Le genre *Cloaca*, créé par Chalmers et moi en 1919 (*Manual of Tropical Medicine*, 3^e édition), peut être défini de la manière suivante : « Entobactériacées (donc bactéries bacilliformes, non-sporulées, Gram-négatives, se développant bien sur tous les milieux usuels en aérobiose et anaérobiose) qui ne sont jamais capsulées, produisent sur milieux gélosés des colonies blanches non-mucoïdes et ne montrent pas le phénomène d' « envahissement », attaquent avec production de gaz le glucose, le lactose (et autres glucides), coagulent ou peptonisent le lait et liquéfient la gélatine (lentement) ».

Ce genre a été accepté au début par de nombreux bactériologues, mais Bergey l'a abandonné et a placé ces bactéries dans le genre *Aerobacter* Beijerinck 1900. A mon avis ce changement n'est pas justifié. Les caractères importants du genre *Aerobacter* dans la définition originale sont : présence de capsules dans quelques états et phases de développement (avec apparence mucoïde des cultures dans ces phases), non-liquéfaction de la gélatine. Il ne me semble pas qu'on puisse y placer des bactéries qui ne montrent jamais ces caractères.

L'espèce type serait : *Cloaca cloacae* (Jordan, 1890) Castellani et Chalmers 1919, avec la variété *levans* (Wolffsin, 1894) et la variété *marocana*, Cast. 1956. La variété *levans* (considérée à un moment par Wolffsin comme une espèce indépendante), n'est pas acceptée par les auteurs modernes, y compris Bergey, parce qu'elle est identique sérologiquement avec l'espèce type *Cloaca cloacae* et aussi en raison de ses caractères biochimiques (excepté la non-fermentation du saccharose).

La variété *marocana* diffère de l'espèce type du point de vue sérologique et du point de vue biochimique en ce qu'elle ne produit pas d'odeur fécale, de pigmentation jaunâtre des colonies sur pomme de terre, de peptonisation du lait, de fermentation acide de la glycérine et par la négativité de la réaction de Voges-Proskauer. Elle diffère, par ces mêmes caractères, de la variété *levans*, si l'on admet cette variété

Je serais heureux d'envoyer des cultures de ce microorganisme aux collègues qui les désireraient.

BIBLIOGRAPHIE

- BERGEY. *Manual of Determinative Bacteriology*. Baillière, Tindall et Cox, Londres, 1948.
- CASTELLANI et CHALMERS. *Manual of tropical Medicine*, 3^e édition, Baillière, Tindall et Cox, Londres, 1919.

ACTION DES SUBSTANCES COLORANTES SUR LES MYCOBACTÉRIES

VII. — COLORANTS DE LA SÉRIE DES PHTALOCYANINES. LEUR INTÉRÊT POUR LA DIFFÉRENCIATION DES GERMES VIRULENTS ET DU BCG.

par JEAN DESBORDES et ETIENNE FOURNIER
(avec la collaboration de M^{me} GAUTIER aide technique à l'I.N.H.).

(Institut National d'Hygiène [professeur BUGNARD]
et Caisse Nationale de Sécurité Sociale, Centre Hospitalier Emile-Roux
[Dr Jean PARAF])

A la suite de nos études sur le comportement des Mycobactéries vis-à-vis des colorants acides et basiques, nous avons entrepris d'explorer l'un des groupes les plus récents de la chimie des colorants dont la structure se révélait particulièrement intéressante : les phtalocyanines.

Rappelons que les composés de cette série ont pour formule brute $(C_{32}H_{16}N_8) Me$, Me étant un métal divalent. Les phtalocyanines sont formées par l'union de quatre molécules de nitrite phtalique avec cet atome métallique bivalent. Ces colorants ont donc une structure qui rappelle celle de pigments respiratoires naturels, tels les porphyrines ou la chlorophylle, la principale différence résidant, pour les phtalocyanines, dans le fait que la soudure du groupe pyrrole se lie au moyen des radicaux N—, au lieu du groupe CH—.

L'étude de la structure aux rayons X révèle que les phtalocyanines représentent un cas de molécule analogue à ce qui se présente chez les noyaux benzéniques, où il n'existe pas réellement de double liaisons à une place définie. On sait qu'il s'agit là d'un phénomène de résonance ou de mésomérie. Signalons enfin que l'énergie de résonance élevée de la molécule explique pour les physiciens sa remarquable stabilité.

Toutes ces propriétés, fort intéressantes en regard des phénomènes physico-chimiques qui ont lieu dans les couches périphériques lipidiques des Mycobactéries, nous ont invités à étudier le comportement des colorants de cette série sur divers bacilles de cette famille.

Nous avons utilisé les colorants appelés « Turquoise Pandurane », solution à 1 p. 1 000, à laquelle ont été ajoutés soit des sels de cuivre, soit des sels de nickel, soit des sels de cobalt, préparés comme il est

exposé plus loin. C'est le sel de cuivre qui nous a donné les meilleurs résultats, que nous rapportons ici.

Les souches testées étaient les suivantes :

- a) *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv,
- b) *Mycobacterium tuberculosis* souche Boyer personnelle,
- c) BCG,
- d) *M. tuberculosis minetti*.

1^o RÉACTIF. — a) On fait dissoudre :

Turquoise Pandurane	10 mg
SO ₄ Cu	100 mg
Eau	10 cm ³

b) On ajoute à cette solution 10 cm³ de solution de carbonate de sodium saturée. Il se produit un précipité. On centrifuge.

c) On utilise comme réactif colorant la solution bleutée surnageante.

2^o TECHNIQUE. — On prélève la valeur d'une anse de platine d'une culture de trois à quatre semaines, sur milieu de Löwenstein, que l'on place dans un tube à centrifuger, on lave à l'alcool-éther, puis à l'eau distillée. On rejette cette dernière et on place sur le culot 2 à 3 cm³ du réactif coloré ; on agite. On examine la couleur des germes au bout de trente minutes. Les couleurs s'affirment au bout de quelques heures (quatre ou cinq), voire vingt-quatre heures au maximum.

3^o RÉSULTATS. — Le tableau ci-joint résume quelques-uns de nos résultats.

**Coloration des culots microbiens
avec la « Turquoise Pandurane » au cuivre (solution 1 p. 1 000).**

SOUCHE	POUVOIR pathogène pour le cobaye	RÉSULTATS	NOTATION de la réaction
H ₃₇ Rv	+++	Bleuté pâle	—
Boyer	++	Bleu moyen faible	±
Minetti	0	Bleu moyen	+
BCG	0	Bleu outremer	++

Nous y relevons une différence essentielle : les germes virulents se colorent peu ou faiblement, les germes avirulents se colorent intensément. La souche *Minetti*, sans être pathogène pour le cobaye, cause cependant, selon Penso, quelques lésions chez cet animal. Elle est considérée comme étant classée à une place différente de celle du BCG. Effectivement, dans notre échelle de notation phthalocyanique, la souche se trouve entre les virulents et le BCG.

Notre réaction de coloration phthalocyanique semble donc présenter un intérêt incontestable pour la caractérisation du BCG.

Nos recherches continuent dans ce domaine, en particulier pour

vérifier le lien-fondé de l'une des deux principales hypothèses susceptibles d'expliquer ce phénomène cyto-chimique. S'agit-il d'une réaction cytologique bactérienne *banale pour les avirulents*, inhibée chez les *germes virulents* par l'existence de substances neutralisantes ou isolantes périphériques au sein d'une sorte de phénomène de concurrence spatiale ? S'agit-il, au contraire, d'une coloration banale par les *germes virulents* exaltée chez les germes avirulents par suite d'une modification de la structure des couches périphériques ?

L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE DES MYCOBACTÉRIES

par A. ANDREJEW, Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET.

(Institut Pasteur de Lille)

Si de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'activité catalasique des Mycobactéries, leur activité peroxydasique, par contre, a été très peu étudiée.

Goris [1] n'a pas trouvé de peroxydase dans les Mycobactéries, tandis que Frei [2] et Giolotti [3], en employant exclusivement les tests qualitatifs, y ont constaté, semble-t-il, une certaine activité peroxydasique.

Dans aucun cas, cette activité n'a été mesurée, ni l'enzyme isolé.

Devant ces résultats peu nombreux et contradictoires, il nous a paru nécessaire de reprendre cette étude et de chercher à mettre en évidence et à mesurer l'activité peroxydasique des Mycobactéries intactes, de leurs broyats et de certaines fractions de ces broyats (en vue de l'isolement de l'enzyme).

En marge de cette étude nous signalons également quelques résultats concernant l'activité peroxydasique des Mycobactéries adaptées à l'INH (hydrazide de l'acide isonicotinique).

On sait que l'activité catalasique des Mycobactéries INH-résistantes est affaiblie ou abolie [4]. Or, comme la catalase, la peroxydase (également un enzyme héminique) forme dans la cellule des systèmes subsidiaires d'oxydation qui éliminent H_2O_2 résultant de l'activité d'autres systèmes. Rappelons que, contrairement à la catalase, la peroxydase ne décompose pas H_2O_2 , mais catalyse, en présence de l'eau oxygénée, l'oxydation d'un grand nombre de phénols et d'amines aromatiques.

MÉTHODES. — Nous avons employé la méthode de Willstätter et Stoll [5], modifiée par Sumner et Gjessing [6], qui est basée sur la propriété de la peroxydase d'oxyder, en présence de H_2O_2 , le pyrogallol en purpurogalline.

L'activité de la peroxydase est fonction de la quantité de purpurogalline formée. Le nombre de milligrammes de purpurogalline formés par milligramme d'enzyme en cinq minutes à 20° correspond à « P. Z. » (Purpurogallin Zahl de Willstätter) et indique sa pureté. Pour la per-

oxydase cristallisée, Theorell [7] a trouvé un P. Z. de 1020 et Keilin et Hartree [8] un P. Z. de 1220.

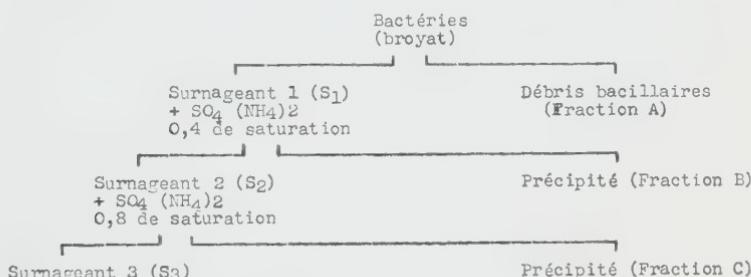
Nous avons préparé la purpurogalline d'après la méthode de Wills-täter et Stoll [5], modifiée par Sumner et Somers [9].

Les dosages de la purpurogalline sont effectués à l'aide d'un électro-photomètre Jobin et Yvon ($\lambda = 430 \text{ m}\mu$).

Notons que la souche de BCG a été obtenue par le Dr A. Tacquet à partir d'un seul bacille et dédoublée ensuite en BCG-CS (sensible à l'INH) et en BCG-CR (cultivée en présence d'INH et devenue résistante à 50 µg d'INH/ml).

RÉSULTATS. — L'activité peroxydasique est mesurée dans les Mycobactéries intactes lavées et dans leurs broyats, obtenus en présence de la poudre de verre, fractionnés et centrifugés à froid, d'après le schéma ci-joint [10].

Le tableau I, qui réunit les résultats obtenus, montre que l'activité



Fractionnement des Mycobactéries pour l'étude de l'activité peroxydasique.

peroxydasique des Mycobactéries intactes, tout en variant suivant les souches et suivant le milieu de culture, reste généralement faible.

Pour un même milieu, l'activité peroxydasique des bacilles tuberculeux virulents (exp. 1, 2, 3, 4) est de même ordre que celle de certains bacilles paratuberculeux saprophytes (exp. 12, 13).

Dans tous les cas étudiés (exp. 5, 7, 11), l'activité peroxydasique est caractérisée par une relative résistance au vieillissement de la culture.

L'activité peroxydasique des broyats (S₁) est généralement plus forte que celle des bacilles intacts dont le broyat est issu.

Les écarts entre l'activité peroxydasique des bactéries intactes et celle de leurs broyats varient avec les souches. Pour certaines souches, l'activité peroxydasique, perceptible après le broyage, peut être pratiquement nulle dans le cas des bactéries intactes (exemple : exp. 4). Il semble donc que l'accessibilité de H₂O₂ (externe) à la peroxydase soit rendue difficile par la structure même de ces bactéries.

Nous avons déjà constaté cette difficulté d'accessibilité dans le cas de leur catalase [11] et lors de notre étude sur l'action de l'azide [10]. En ce qui concerne la catalase, ce phénomène a été depuis confirmé et étudié par Uecker [12]. La question d'accessibilité (même à pH 4,4,

TABLEAU I. — Activité peroxydase des Mycobactéries et de leurs fractions.

N°	Souche	Variante	Milieu	Age (jours)			Fraction	P.Z.
				37°	20°	4°		
1	H37 Rv.	Humain virulent	Long	12			B. intacts	0,004
2	RI Rv.	Humain virulent	Long	12			B. intacts	0,002
3	Ravenel	Bovin virulent	Löwenstein	43			B. intacts	0,001
4	A17	Aviaire virulent	Long	11	3		B. intacts	0
							S ₁	0,052
							S ₁ (dialysé)	0,089
							B	0,290
							C	0,504
5	A17	Aviaire virulent	Long	24	58		B. intacts	<0,001
6	H37 Ra	Humain avirulent	Long	30			B. intacts	0,076
7	H37 Ra	Humain avirulent	Long	12	55		B. intacts	0,035
							B. intacts	0
							B. intacts	0,051
							B. intacts	0,032
8	B.C.G.	Bovin avirulent	Long	10	4		B. intacts	0,550
							B	0,545
							C	1,538
							B. intacts	0,002
9	M. phlei	Para-tuberculeux saprophyte	Long	6	92		B. intacts	0,001
							B. intacts	0
10	M. Grassberger	Para-tuberculeux saprophyte	Long	2			B. intacts	0
							B. intacts	0
11	M. Lacticola	Para-tuberculeux saprophyte	Long	2			B. intacts	0
							B. intacts	0
12	B.C.G. CS	Bovin avirulent sensible à l'INH	Long	37			B. intacts	0,002
							B. intacts	0
13	B.C.G. CR	Bovin avirulent résistant à 50 µg d'INH/ml.	Long	37			B. intacts	0
							B. intacts	0
14	H37 Ra S	Humain avirulent sensible à l'INH	Dubos	9			B. intacts	0,007
							B. intacts	0
15	H37 Ra R	Humain avirulent résistant à 5 µg d'INH/ml.	Dubos	9			B. intacts	0
							B. intacts	0
16	M. phlei TS	Para-tuberculeux saprophyte sensible à 150 µg d'INH/ml.	Gélose + sang auto-clavé	19			B. intacts	<0,001
							B. intacts	0
17	M. phlei TR	Para-tuberculeux saprophyte résistant à 500 µg d'INH/ml.	Gélose + sang auto-clavé	19			B. intacts	0
							B. intacts	0

l'azide exalte la respiration et par conséquent n'accède pas à la cytochrome oxydase [10]) semble donc présenter quelques aspects particuliers dans le cas des Mycobactéries.

La fraction A (débris bacillaires, obtenus par centrifugation fractionnée) et le surnageant 3 (dialysé) ne manifestent aucune activité peroxydasique. Il est donc évident que la peroxydase de ces bactilles passe entièrement en solution.

Dans tous les cas, la fraction C [comprise entre 0,4 et 0,8 de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$], présentant le PZ le plus élevé, correspond donc à la teneur la plus forte en enzyme.

Les bacilles tués par la chaleur ne produisent pas de purpurogalline.

Comme le montrent, d'autre part, les exemples 14, 15, 16, 17, 18 et 19 (tableau I), ainsi que les expériences récentes qui ne figurent pas au tableau, les bactéries adaptées à l'INH ne manifestent, à l'état intact et par rapport à la souche mère, qu'une activité peroxydasique affaiblie ou nulle. Leur passage sur un milieu riche en hémine (gélose au sang) ne modifie pas cet état de choses. L'étude de leurs broyats est en cours.

CONCLUSION. — L'activité peroxydasique est mise en évidence et mesurée dans les Mycobactéries. L'enzyme est extrait.

Les bactéries adaptées à l'INH (hydrazide de l'acide isonicotinique) donnent lieu à une activité peroxydasique affaiblie ou nulle.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GORIS (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, **24**, 497.
- [2] FREI (W.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1935, **134**, 26.
- [3] GIOLOTTI (G.). *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.*, 1949, **3**, 547.
- [4] MIDDLEBROOK (G.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [5] WILLSTATTER (R.) et STOLL (A.). *Untersuchungen über Enzyme*, 1928, **1**, 414.
- [6] SUMNER (J. B.) et GLESSING (E. C.). *Arch. Biochem.*, 1943, **2**, 291.
- [7] THEORELL (H.) et MAEHLY (A. C.). *Acta Chem. Scand.*, 1950, **4**, 422.
- [8] KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Biochem. J.*, 1951, **49**, 88.
- [9] SUMNER (J. B.) et SOMERS (G. F.). *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*, Acad. Press Inc., édit., New-York, 1944.
- [10] ANDREJEW (A.). *Thèse Doct. Univ. Paris*, 1954.
- [11] ANDREJEW (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 833.
- [12] UEKER (W.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1955, **164**, 424.

DÉTERMINATION DE LA RACE DU BACILLE TUBERCULEUX DE 331 SOUCHES ISOLÉES DANS L'AGGLOMÉRATION LYONNAISE

par J. VIALLIER.

(*Institut Pasteur de Lyon*)

Une étude systématique, poursuivie depuis novembre 1951, nous a permis d'étudier la race de 331 souches de bacilles tuberculeux, obtenues parmi plusieurs milliers d'ensemencements de produits pathologiques divers provenant de malades hospitalisés dans les hôpitaux de Lyon. Toutes ces souches ont été obtenues sur milieu de Löwenstein, par ensemencement direct ou à partir du ganglion inguinal du cobaye tuberculisé par inoculation du produit, après traitement par l'acide sulfurique. Elles ont été injectées au lapin par voie intraveineuse, à la dose de 1/100 de milligramme par kilogramme. Nous avons, en effet, tenu compte uniquement des résultats de l'épreuve de Park, c'est-à-dire du pouvoir pathogène pour le lapin. L'animal inoculé a été sacrifié entre le soixante-quinzième et le quatre-vingt-dixième jour et l'autopsie pratiquée. Le bacille bovin, dans ces conditions, amène la mort du lapin avant le soixantième jour et à l'autopsie les viscères présentent des lésions de tuberculose expérimentale classique.

Parmi ces 331 souches nous avons trouvé ainsi 317 bacilles humains et 14 bacilles bovins. Treize avaient été retirées de lésions tuberculeuses présentées par des enfants, un seul d'un adulte. L'origine de ces souches bovines par rapport au produit ensemencé s'établit ainsi :

Parmi 67 souches isolées de crachats provenant de 67 sujets porteurs de lésions de tuberculose pulmonaire, la plupart peu de temps après le dépistage et non encore traités, une seule souche bovine a été décelée. Elle a été retirée de l'expectoration d'une malade atteinte de tuberculose pulmonaire depuis quatre ans et traitée par antibiotiques depuis cette époque. Le bacille avait conservé son pouvoir pathogène pour le lapin.

163 liquides de tubages gastriques provenaient en grande majorité d'enfants hospitalisés dans des services de pédiatrie ou de phtisiologie, pour des manifestations d'une primo-infection tuberculeuse ayant nécessité une hospitalisation. Nous n'avons trouvé aucune souche bovine.

12 liquides pleuraux donnèrent des souches humaines.

52 liquides céphalo-rachidiens de méningites tuberculeuses nous ont fourni 2 souches bovines et 50 souches humaines.

23 pus, en majorité d'origine ganglionnaire cervicale, et 2 pus de

tuberculose chirurgicale nous ont donné 9 souches bovines (dont les 2 pus de tuberculose chirurgicale).

20 souches provenant de divers prélèvements (sang, prélèvements bronchiques, urines) se montrèrent de type humain.

Les premiers résultats de notre enquête s'harmonisent avec les données classiques. L'étude très détaillée effectuée par Gernez-Rieux, Gervais et Tacquet, fait état d'une statistique bibliographique mondiale totalisant 43 381 identifications dans le monde entier. Sur 16 598 souches de bactéries tuberculeuses isolées de cas de tuberculose extrapulmonaire, 16,5 p. 100 étaient de type bovin. Sur 26 783 souches isolées de cas de tuberculose pulmonaire, 2,6 p. 100 appartenaient au type bovin. En France, par contre, les déterminations bactériologiques ne mettent en évidence le bacille bovin que dans une très faible proportion de tuberculoses examinées.

Nous n'avons pas tenu compte, pour la détermination de la race du bacille, des autres caractères proposés : aspect des cultures, dissociation des colonies, absence d'activité uréasique dans certaines conditions, qui nous ont semblé dénués de spécificité.

SUR L'INOCULATION DE *VIBRIO FÆTUS* A LA FEMELLE GESTANTE DE COBAYE

par H. JACOTOT et A. VALLÉE
(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale)

L'étude expérimentale de *Vibrio fætus* par inoculation aux petits animaux de laboratoire est restée, jusqu'à présent, assez étroitement limitée, les recherches les plus nombreuses reposant sur la réceptivité vis-à-vis de cet agent microbien, de l'utérus de la femelle de cobaye en état de gestation, ou simplement préparée par injection d'un sel d'oestradiol.

Nous nous sommes proposé d'étudier comparativement à ce point de vue, dans des conditions déterminées, un certain nombre de souches, humaines d'une part, animales de l'autre, celles-ci presque toutes d'origine bovine (1).

Pour infecter la femelle de cobaye, l'inoculation intraperitoneale est l'une des plus sûres et elle provoque souvent l'avortement ; mais cet accident ne permet pas à lui seul de tirer une conclusion, car l'injection dans le péritoine d'un liquide dépourvu de toute nocivité, la simple effraction de la séreuse, les chocs, peut-être même l'émotion résultant des manipulations sont susceptibles d'entraîner l'expulsion

(1) Nous exprimons ici nos remerciements à notre collègue, le Dr Thibault, qui a bien voulu mettre à notre disposition la plupart des souches humaines. La plupart des souches animales sont des souches françaises isolées par nous.

du foetus. Il est probable au surplus que, indépendamment du moment de la gestation, la sensibilité individuelle est, en ce domaine, un facteur important.

Dès lors, il nous a semblé qu'une sollicitation renforcée du péritoine entraînerait un certain alignement des réactions individuelles et abrégerait les délais dans lesquels la réponse pourrait être recherchée.

TABLEAU I. — Souches humaines.

Souches	Cobayes	Délais en jours	Recherche de Vibrio-Foetus		Remarques
			Avec avortement	Sans avortement	
5515	17.1 - < - 3 - 4 17.44 - 45 - 46 - 47	1 < 1 1 1 1 1 1	+ (Corne.Viscères) + (id.) + (id.) + (id.) + (id.) + (id.) + (id.) + (id.)		
5443	59.42 - 43 - 44 - 45 - 46	1 1 1 1 1	0 + (Corne) + (Corne) + (Cernes) + (Cernes)		Corne non gravigide
5399	59.68 - 69 - 70 - 71 - 72	1 1 1 1 1	+ (Corne) + (Corne) 0 C 0		
53104	59.63 - 64 - 65 - 66	1 2 1 1	+ (Corne) 0 0 + (Corne)		
5444	59.53 - 54 - 55 - 57	< 1 1 1	+ (Corne) + (Corne) 0 0	+ (Corne)	
A.169	58.76 - 77 - 78 - 79 - 80	1 1 2 2 1	+ (Foie) 0 + (Corne)	+ (Corne.Coeur.Foetus) + (Cornes)	Morte
A.168	58.51 - 52 - 53 - 54 - 55	< < < 1 1		0 0 0	
AM.	14.35 - 36 - 37 - 38	< < < 1		0 0	1er mois de gestation
5437	10.77 - 76 - 79 - 80 17.7 - 8 - 9 - 10	3 1 1 1 2 1 1 2	+ (Corne) 0 0 0 + (Corne) 0 0 + (Corne.Foetus)	0	
5411	16.57 - 58 - 59 - 60 17.11 - 12 - 13 - 14	5 5 1 1 4 4 1 1	0 0 0 0 0 0 + (Corne.Viscères)	0 0	

Pour obtenir cette stimulation, nous avons ajouté à la suspension du vibrion une suspension de mucine. Nous inoculons ainsi à chaque animal 2 ml d'un mélange à parties égales d'une culture en bouillon gélosé de quatre jours et d'une suspension de mucine au vingtième.

Dans ces conditions, les souches les plus aptes à infecter la femelle

TABLEAU II. — Souches animales.

Souches	Cobayes	Recherche de Vibrio-Foetus			Remarques
		Delais en jours	Avec avortement	Sans avortement	
AND	74.81 - 82 - 83 - 84 - 85	1 1 1 1 1	+ (Cornes,Coeur) + (Cornes,Foie,Coeur) + (Cornes,Coeur) + (Cornes,Foie,Coeur) + (Cornes,Foie,Coeur)		
BC	16.11 - 13 - 14	1 1 1	+ (Cornes,Viscères) + (Cornes) + (Corne)		
DL 2	59.58 - 59 - 60 - 62	1 1 1 1	0 + (Corne) + (Corne,Coeur) + (Cornes,Foie,Coeur)		
B 3	59.9 - 10 - 11 - 12	1 1 1 1	+ (Cornes) + (Cornes) + (Foetus)	C	
V 1	19.71 - 72 - 73 - 74 57.92 - 93 - 94 - 95 - 96	2 2 2 1 1 2 2 2 2		0 0	
DL	15.9 - 10 - 11 - 12	1 1 2 2	+ (Corne,Vagin,Foetus) + (Cornes,Foetus)		
B	14.91 - 92 - 93 - 94	1 1 2 2	+ (Cornes) 0 + (Cornes)	+ (Corne,Foetus)	Morte
H	1d.25 - 25 - 26 - 27	1 1 3 3	+ (Cornes) + (Corne)	0	
QU	14.95 - 96 - 97 - 98	1 1 1 2	0 0 0	+ (Cornes)	Morte
T 2	57.97 - 98 - 99 - 0 58.1	3 1 1 3 3	+ (Corne) 0	0 0 0	
10.64	14.57 - 56 15.21 - 22 - 23	2 1 1 2 1	0 0 0	0 0	1er mois de gestation
GR	15.2 - 3 - 4	2 3 3		0 0 0	

gestante se répandent très rapidement dans l'organisme de l'animal ; cette constatation nous a conduits à sacrifier deux ou trois jours après l'inoculation les femelles qui n'avortent pas, celles qui avortent étant sacrifiées le plus tôt possible après l'expulsion. Des ensemencements en bouillon gélosé sont alors effectués systématiquement à partir de l'utérus, par prélevements à l'intérieur des cornes ; on complète par des ensemencements à partir d'un ou plusieurs viscères de la femelle ; foie, rate, rein, cœur, encéphale, et par des ensemencements à partir du fœtus.

Les résultats de nos inoculations ont été réunis dans les deux tableaux joints. A quelques exceptions près, qui sont mentionnées, toutes les inoculations ont été faites au cours du deuxième mois de la gestation.

Il se dégage de ces constatations que l'agressivité de *Vibrio fætus* pour la femelle gestante de cobaye varie d'une souche à l'autre dans de larges limites : la souche humaine 5411 et la souche animale GR sont presque totalement dépourvues de pouvoir infectieux ; leur aptitude à se multiplier dans l'organisme de leur hôte expérimental est nulle ou très faible dans les jours qui suivent l'inoculation. A l'opposé, les souches humaines 5515 et 5443 et les souches animales BC, DL 2 et AND gagnent rapidement l'utérus et se trouvent à la surface de sa muqueuse dans les vingt-quatre heures ; les souches 5515 et AND, particulièrement virulentes, envahissent simultanément les viscères.

On remarquera, d'autre part, que ces souches hautement infectieuses, ont provoqué l'avortement chez toutes les femelles inoculées et dans de courts délais (moins de vingt-quatre heures dans 15 cas sur 16) ; leur pouvoir abortif, lié évidemment à leur agressivité, ne saurait être mis en doute.

Les autres souches possèdent des propriétés intermédiaires ; en prenant en considération les observations faites au début de cette note, on pourrait discuter sur la réalité de leur pouvoir abortif. A vrai dire, la plupart, et même les moins pathogènes, ont provoqué l'expulsion du fœtus dans les vingt-quatre heures ; or si, comme nous l'avons constaté, la mucine, le bouillon gélosé et leur mélange sont aptes à déterminer l'avortement en dehors de toute action vibrionienne, ce n'est pas régulièrement dans les vingt-quatre heures, mais, tout aussi souvent, dans des délais allant jusqu'à douze jours ; on peut donc considérer légitimement que ces souches, peu pathogènes, possèdent à un certain degré le pouvoir de provoquer expérimentalement, ou à tout le moins, de favoriser l'avortement de la femelle de cobaye.

On pourrait se demander si la faible activité de certaines souches n'est pas due à ce que, isolées depuis longtemps, elles se sont atténuées, ou par le fait du vieillissement ou par suite de multiples repiquages ; mais il ne paraît pas qu'il en soit ainsi : les souches humaines 5411 et 5415 ont été isolées toutes les deux en février 1954, les souches animales 10624 et B sont toutes les deux des souches de collection envoyées des Etats-Unis il y a plusieurs années ; enfin, celles que nous avons isolées nous-mêmes ont été inoculées dans des délais relativement courts, après un petit nombre de repiquages.

En résumé, les essais effectués avec 10 souches humaines et 12 souches animales de *V. fætus*, et reposant sur l'inoculation intraperitoneale

à la femelle gestante de cobaye, d'un mélange à parties égales de suspension microbienne et de mucine au vingtième, nous conduisent à la conclusion suivante : le pouvoir pathogène de *V. fætus* pour la femelle gestante de cobaye varie dans de larges limites d'une souche à l'autre ; il s'exprime en premier lieu par l'aptitude plus ou moins accusée du microbe à gagner le conduit génital puis à envahir l'organisme de l'animal et les foetus ; il se traduit aussi par la propriété de provoquer l'avortement, mais il s'agit là d'un caractère n'ayant qu'une valeur relative, et dont il est difficile d'apprécier la signification lorsque l'on n'a pas pu mettre le vibron en évidence.

Il n'est pas irrationnel de penser que dans les espèces animales naturellement réceptives, et, éventuellement dans l'espèce humaine, *V. fætus* puisse, en raison même des variations de son pouvoir pathogène, déterminer des troubles d'inégale gravité.

RELATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE LES *SALMONELLA* DU GROUPE D ET *PASTEURELLA PSEUDOTUBERCULOSIS* TYPE IV

par M. TOUCAS, G. GIRARD et L. LE MINOR.

(Institut Pasteur, Paris)

Dans un lot de 46 souches, de *Pasteurella pseudotuberculosis* reçues en 1955 pour être classées sérologiquement, l'une agglutinait fortement sur lame avec le sérum anti-IV. Le taux d'agglutination, déterminé ensuite par l'épreuve en tubes, fut à 1/2 000. Comme aucune souche du groupe IV n'avait jusqu'alors été isolée en France et qu'on n'en connaissait qu'un seul exemplaire en Europe [1], nous avons recherché les propriétés de cette souche. En fait, il s'agissait d'une souche typique de *Salmonella gallinarum-pullorum* qu'une erreur d'étiquetage avait fait insérer parmi les souches de pseudotuberculose.

Poursuivant les agglutinations sur lame, nous avons constaté que les souches de *Pasteurella pseudotuberculosis* du groupe IV agglutinent également dans le sérum anti-IX des salmonelles. Inversement, les souches de *S. typhi* W et *S. gallinarum* (13 souches testées) sont agglutinées sur lame par le sérum anti-IV des *Pasteurella pseudotuberculosis*.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — Nous avons utilisé les sérums suivants préparés par injection intraveineuse au lapin :

- a) Sérum anti-*pseudotuberculosis* IV (souche 32 IV) ;
- b) Sérum anti-*S. typhi* (souche O 901) ;
- c) Sérum anti-*gallinarum* (souche type du Centre International des *Salmonella*).

Nous avons effectué les titrages d'agglutinines des sérums avec les

souches correspondantes, puis les agglutinations croisées. Le tableau I donne les résultats obtenus.

TABLEAU I.

	Suspension O de <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV	Suspension O de <i>S. gallinarum</i>	Suspension O de <i>S. typhi</i> O 901
Sérum anti-pseudo-tuberculosis 32 IV	12.800 ±	800	6.400
Sérum anti-gallinarum	6.400	6.400	6.400
Sérum anti-O 901	1.600 ±	800	12.800

Pour vérifier si les antigènes I et XII des *Salmonella* étaient en cause, nous avons recherché l'agglutination en tubes des suspensions O de *S. paratyphi* A (I, II, XIII), *S. paratyphi* B (IV, V, XII), *S. essen* (IV, XII) dans le sérum anti-pseudotuberculosis 32 IV. Toutes ces agglutinations furent négatives. L'antigène IX (ou une fraction de l'antigène IX) est donc seul en cause.

Nous avons ensuite effectué les saturations croisées suivantes :

- 1° Sérum anti-*S. gallinarum* par *Pasteurella pseudotuberculosis* 32 IV ;
- 2° Sérum anti-*S. typhi* O 901 par *Pasteurella pseudotuberculosis* 32 IV ;
- 3° Sérum anti-pseudotuberculosis 32 IV par *S. typhi* O 901 ;
- 4° Sérum anti-pseudotuberculosis 32 IV par *S. gallinarum*.

Ces saturations ont été effectuées avec des suspensions chauffées deux heures à 100° et les titrages effectués vis-à-vis des suspensions O des trois germes (tabl. II).

Ces résultats montrent que les *Pasteurella pseudotuberculosis* du groupe IV possèdent une fraction antigénique commune avec l'anti-

TABLEAU II.

	Pasteurella pseudotuberculosis 32 IV	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. typhi</i> O 901
1) Sérum anti- <i>S. gallinarum</i> absorbé par <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV	0	1.600	3.200
2) Sérum anti- <i>S. typhi</i> absorbé par <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV	0	200	6.400
3) Sérum anti- <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV absorbé par <i>S. typhi</i>	3.200	0	0
4) Sérum anti- <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV absorbé par <i>S. gallinarum</i>	3.200	0	400

gène IX des salmonelles. Cette fraction antigénique est commune à *S. typhi* et *S. gallinarum*, comme le confirme le tableau III.

TABLEAU III.

	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. typhi O 901</i>	<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> 32 IV
A) Sérum anti- <i>S. typhi</i> saturé par <i>S. gallinarum</i>	0	6.400	0
B) Sérum anti- <i>S. gallinarum</i> saturé par <i>S. typhi O 901</i>	200	0	0

Dans le tableau II on voit que le sérum anti-*pseudotuberculosis* 32 IV absorbé par la souche de *S. gallinarum* conserve encore des agglutinines vis-à-vis de la suspension O de *S. typhi* et n'en possède plus vis-à-vis de la souche *gallinarum*. Il est en effet connu que, malgré une même formule antigénique globale, les *Salmonella gallinarum* et *typhi* possèdent des fractions différentes dans leurs antigènes somatiques.

Pirosky [2] avait montré, en 1938, l'existence de rapports antigéniques entre certaines pasteurelles aviaires et les *Salmonella* du groupe D. Kauffmann [3] a, d'autre part, mis en évidence des agglutinations croisées entre des *Pasteurella pseudotuberculosis* et les salmonelles du groupe B. Récemment, Knapp [4] a montré qu'il existait des rapports antigéniques entre *Pasteurella pseudotuberculosis* IV et les salmonelles du groupe D.

RÉSUMÉ. — Il existe des facteurs antigéniques communs entre *P. pseudotuberculosis* IV, *S. gallinarum* et *S. typhi*. Le facteur commun est une fraction de l'antigène IX des *Salmonella*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GIRARD (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 227.
- [2] PIROSKY (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 347.
- [3] KAUFFMANN (F.). *Z. Hyg.*, 1932, **114**, 97.
- [4] KNAPP (W.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1955, **164**, 57.

LES ANTIGÈNES HÉTÉROPHILES J, R ET A DES PLAQUETTES ET LEUCOCYTES HUMAINS

par A. EYQUEM, M^{me} L. PODLIACHOUK et B. MAUPIN.

(Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE]
et Centre de Transfusion et de Réanimation de l'Armée
[Directeur : Médecin-colonel J. JULLIARD])

La découverte des agglutinines anti-thrombocytaires a permis d'attribuer un mécanisme immunologique à certains purpura thrombopéniques [4, 2].

Certains de ces anticorps sont néanmoins difficiles à mettre en évidence par agglutination directe, alors qu'ils peuvent l'être par la technique de Tullis, la réaction indirecte de Coombs, la fixation (ou consommation) de l'antiglobuline, selon Steffen ou Moulinier.

Les espoirs fondés sur l'action des transfusions de plaquettes chez l'homme, ont encouragé les travaux de laboratoire ayant pour but de préciser l'équipement antigénique des plaquettes ; certains de ces antigènes peuvent être rendus responsables des échecs des transfusions de plaquettes.

Par iso-agglutination, Stefanini et Plitman [3] ont individualisé deux antigènes, tandis qu'Harrington a distingué huit groupes [4].

En effectuant l'épreuve d'absorption, différents auteurs ont établi la présence des antigènes humains A et B sur les plaquettes humaines [5, 6, 7, 8, 18, 19].

Ils ont observé qu'il y avait coïncidence entre le type antigénique des globules rouges et celui des plaquettes (A, B, AB et O) et que la concentration des plaquettes en antigènes A ou B est environ quatre fois supérieure à celle du plasma AB.

La réaction de coagglutination a pu être utilisée par Coombs pour déceler les antigènes A et B sur les plaquettes, par la formation d'agglutinats mixtes de plaquettes et de globules rouges [9].

Les antigènes du système Rh, C, D, E, c et e ont été révélés sur les plaquettes par la réaction indirecte de Coombs, après fixation des agglutinines anti-Rh (Ruggieri [10]) ou par la fixation ou la consommation de l'antiglobuline suivant Steffen [11] ou Moulinier [12]. Ils ne l'ont pas été par absorption ou agglutination directe [20].

Il existe, de plus, des antigènes thrombocytaires hétérophiles communs aux plaquettes humaines et à celles d'animaux de différentes espèces [13]. On pouvait envisager la mise en évidence de certains antigènes thrombocytaires en utilisant leur caractère hétérophile et notamment celui qui est commun à l'antigène érythrocytaire humain A, aux antigènes plasmatiques bovin J, ovin R (1) et porcin A [14, 15, 16].

Nous avons donc recherché les antigènes J, R, A, sur les différents

(1) L'antigène ovin R est identique à l'antigène A de l'étude de P. Millot et A. Eyquem (*Rev. Path. gén. comp.*, 1955, (nos 673, 1245).

lots de plaquettes humaines en étudiant leur pouvoir absorbant vis-à-vis de différents anticorps : les iso-agglutinines humaines anti-A, B, H et A₁, ainsi que les iso-agglutinines porcine anti-A, ovine anti-R et l'iso-hémolysine bovine anti-J.

Après quelques essais préliminaires destinés à évaluer la concentration approximative des antigènes, dans des préparations provenant du mélange des sangs de plusieurs donneurs, nous avons étudié des suspensions concentrées de plaquettes humaines préparées par centrifugations successives d'un culot leucocyto-plaquettaire provenant du prélèvement de sang d'un seul donneur. Les leucocytes ont été préparés dans le même temps en utilisant l'artifice de la sédimentation paradoxale [47], appliquée cette fois à un seul flacon. Le plasma et les globules rouges, ceux-ci lavés trois fois, ont été prélevés pour étude comparative.

On obtient ainsi une suspension plaquettaire qu'on peut considérer d'une pureté satisfaisante du point de vue immunologique car, dans ces conditions, il n'y a pratiquement plus de globules rouges et la contamination leucocytaire est négligeable, de l'ordre de 1 leucocyte pour 10 000 plaquettes. La concentration de cette suspension est de l'ordre de 20 milliards de plaquettes par millilitre.

Les épreuves d'absorption ont été réalisées en mettant en contact 0,05 ml de suspension de plaquettes avec 0,15 ml de chacun des sérums à étudier, pendant deux heures à 20°.

Après centrifugation, l'activité agglutinante du sérum a été comparée à celle du sérum non absorbé, dilué dans la même proportion avec de l'eau physiologique.

La suspension leucocytaire est à une concentration de 250 millions de leucocytes par millilitre. Ces leucocytes ont été lavés cinq fois après séparation et la contamination érythrocytaire ne dépasse pas 1 globule rouge pour 200 leucocytes. La contamination plaquettaire est de 1 plaquette pour 1 leucocyte, ce qui est négligeable, puisque la surface approximative d'une plaquette est de $10 \text{ } \mu^2$, tandis que celle des leucocytes est de $100 \text{ } \mu^2$. Dans 1 ml de suspension de plaquettes, un nombre de 20 milliards offrirait une surface théorique de $2 \times 10^{11} \text{ } \mu^2$, tandis que 250 millions de leucocytes offriraient une surface théorique de $2,5 \times 10^{10} \text{ } \mu^2$. Le tableau ci-joint résume les résultats obtenus à l'examen des suspensions de plaquettes, de leucocytes et de plasma de trois donneurs appartenant respectivement aux groupes A, B, O.

On peut en conclure que les plaquettes et leucocytes des donneurs du groupe O n'absorbent pas les anticorps étudiés ; les plaquettes, les leucocytes et le plasma du donneur B absorbent l'iso-agglutinine humaine anti-B, mais n'ont pas d'action sur les autres anticorps.

Les plaquettes, les leucocytes et le plasma du groupe A absorbent l'iso-hémagglutinine humaine anti-A, mais, de plus, les iso-agglutinines porcine anti-A et ovine anti-R. Fait à remarquer, le pouvoir absorbant est beaucoup plus important vis-à-vis de ces deux anticorps que vis-à-vis de l'iso-agglutinine humaine anti-A.

L'iso-hémolysine bovine n'est que faiblement absorbée par le plasma A, alors qu'elle est totalement inhibée par les plaquettes et les leucocytes A.

TABLEAU I. — Tritrage des fractions de différents antisérum absorbés par des suspensions de plaquettes et de leucocytes humains.

TITRE	BOVIN ANTI-J			OVIN ANTI-R			PORCIN ANTI-A			HUMAIN ANTI-A			HUMAIN ANTI-B		
	4	8	16	32	4	8	16	32	4	8	16	32	4	8	16
PLAQ.	0	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
LEUC.	0	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
LEUC + PLAQ. 0	#	#	-	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
PLASMA 0	#	#	-	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
PLAQ.	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEUC.	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLASMA A	#	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLAQ.	B	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
LEUC.	B	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
LEUC + PLAQ B	#	#	-	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
PLASMA B	#	#	-	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
MÉLANGE PLAQ 0	#	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
" " " A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLAQ	A ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLAQ	A ₂	#	#	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#
MÉLANGE PLAQ ABO	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	#	#	-	-
SER. TEMPIN NON ABSORBÉ	#	#	-	-	#	#	-	#	#	#	-	#	#	#	#

La comparaison de suspensions de plaquettes provenant de sujets des groupes A₁ et A₂ a confirmé que la concentration antigénique des plaquettes A₁ est plus forte que celle des plaquettes A₂ [18 à 21]. Ces dernières n'absorbent presque pas l'iso-agglutinine porcine anti-A, alors que le titre de celle-ci est diminué de 32 à 2 par les plaquettes A₁. Il en est de même des anticorps anti-R et anti-J.

Nous n'avons pas tenu compte des résultats obtenus par l'absorption de la lectine ou phytoagglutinine d'*Ulex europeus* (anti-H), car celle-ci peut être aussi réalisée par des sucres simples (W. T. J. Morgan).

La valeur des résultats obtenus peut être discutée, puisqu'il n'est pas encore possible d'affirmer que les antigènes hétérophiles ainsi décelés n'ont pas été absorbés par les plaquettes à partir du plasma, comme peuvent l'être l'antigène érythrocytaire J chez les bovins et les antigènes Lea et Leb chez l'homme.

La même réserve peut être observée vis-à-vis de la preuve de l'existence des antigènes érythrocytaires humains A et B sur les plaquettes. Ces antigènes sont maintenant considérés comme faisant partie intégrante de la structure plaquettaire. Par contre, le comportement, vis-à-vis de l'hémolysine bovine anti-J, des plaquettes et leucocytes A, est totalement différent de celui du plasma humain du même sujet, puisque celui-ci n'inhibe que faiblement cette iso-hémolysine.

On en vient donc à considérer que les plaquettes et leucocytes A possèdent l'antigène hétérophile J dont le plasma homologue est pauvre. Les plaquettes et les leucocytes A possèdent les antigènes hétérophiles J, R et A avec une concentration quatre ou huit fois plus forte que celle de l'antigène humain.

Il n'est pas impossible que cette notion puisse être mise à profit pour la recherche de thromboagglutinine à l'aide de suspension de plaquettes possédant ces antigènes hétérophiles et notamment provenant d'animaux dont le plasma ne possède pas ces antigènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DAUSSET (J.). *Immuno-Hématologie*, Flammarion, édit., Paris, 1956.
- [2] MAUPIN (B.). *Les plaquettes sanguines chez l'homme*, Flammarion, édit., Paris, 1954.
- [3] STEFANINI (N. M.) et PLITMAN (J.). *J. clin. Invest.*, 1953, **32**, 606.
- [4] HARRINGTON (W. J.), HOLLINGSWORTH (J. W.) et MOORE (C. V.). *J. Lab. clin. Med.*, 1951, **38**, 1.
- [5] GUREVITCH (J.) et NELKEN (D.). *Nature*, 1954, **173**, 356.
- [6] RUGGIERI (P.) et BOZOGNESI (G.). *Boll. Soc. ital. Ematol.*, 1954, **2**, 127.
- [7] DAUSSET (J.). *Vox sanguinis*, 1954, **4**, 204.
- [8] MOUREAU (P.) et ANDRÉ (A.). *Vox sanguinis*, 1954, **4**, 46.
- [9] COOMBS (R. R. A.) et BEDFORD (D.). *Vox sanguinis*, 1955, **5**, 111.
- [10] RUGGIERI (P.). *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1955, **34**, 1.
- [11] STEFFEN (C.). *Klin. Wschr.*, 1955, **33**, 134 et 496.
- [12] MOULINIER (J.). *Comm. II^e Congr. Nat.*, Bordeaux, 1956, 65.
- [13] SAINT-PAUL (M.), MILLOT (P.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 402.
- [14] NEIMANN-SORENSEN (A.), RENDEL (J.) et STONE (W. M.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 407.
- [15] EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 419.

- [16] PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur (sous presse)*.
- [17] MAUPIN (B.). *Le Sang*, 1955, **26**, 328.
- [18] BERROCHE (L.), MAUPIN (B.), HERVER (P.) et DAUSSET (J.). *Vox sanguinis*, 1955, **5**, 82.
- [19] SCHAFER (K.) et GENNERICH (H.). *Klin. Wschr.*, 1938, **18**, 491.
- [20] MEYER (W.), WUILLERET (B.) et HASSIG (A.). *Z. Immunitätsf.*, 1955, **412**, 369.
- [21] GUREVITCH (J.) et NELKEN (D. J.). *J. Lab. clin. Med.*, 1955, **46**, 530.

A PROPOS DE LA NUMÉRATION DE LA FLORE TOTALE TELLURIQUE. TECHNIQUE EN MILIEU LIQUIDE

par M.-A. CHALVIGNAC.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Le problème de la numération de la flore totale tellurique a fait l'objet de très nombreuses études. C'est en effet l'un des temps essentiels de l'analyse d'une terre. Le nombre même des méthodes proposées montre tout à la fois l'importance du problème et ses difficultés. Nous ne passerons pas en revue toutes ces méthodes, trop nombreuses, mais nous nous contenterons seulement d'énumérer leurs difficultés, pour enfin essayer de dégager celles qui nous paraissent les meilleures d'un point de vue pratique.

Toutes les techniques proposées peuvent se ramener à deux méthodes générales :

a) *La microscopie directe*. Son principe en est excellent, mais présente deux inconvénients : l'un, d'une importance majeure, qui est de numéarer indifféremment germes vivants et germes morts, l'autre d'être long et fatigant. C'est pourquoi, afin de parer à la première difficulté, de nombreux auteurs se sont efforcés d'employer une technique de culture ne mesurant que des germes vivants, seuls intéressants dans le sol.

b) *La méthode par dilution*, préconisée dans ce but, consiste essentiellement à ensemencer un milieu solide ou liquide avec des dilutions-suspensions de terre.

Dans le cas des milieux solides, ensemencés soit en surface, soit en profondeur, le nombre de germes par gramme de terre est déterminé par comptage des colonies sur plaque gélose-extrait de terre.

Quant à la méthode en milieu liquide faisant principalement l'objet de cette note, nous en donnerons plus loin les détails.

I. DIFFICULTÉS GÉNÉRALES DES MÉTHODES PAR DILUTIONS. — Deux points essentiels sont à considérer.

a) *Problème du milieu*. Il est bien évident que le milieu utilisé aura une influence décisive sur le nombre de germes trouvés. C'est peut-

être sur ce point que les auteurs ont le plus travaillé et ont proposé le plus grand nombre de formules. L'expérience nous a montré qu'aucune des formules proposées ne semblait avoir d'avantages sur le milieu à l'extrait de terre. C'est pourquoi nous nous sommes attaché à utiliser essentiellement l'extrait terre comme milieu.

b) *Problème des dilutions.* Différents auteurs ont déjà attiré l'attention sur le fait qu'il est difficile d'obtenir des suspensions homogènes de dilution de terre [1]. Ce problème étant à l'étude dans le laboratoire, nous ne ferons que signaler sa difficulté principale, à savoir que, d'une part la nature physico-chimique d'un sol intervient dans la distribution des germes, d'autre part les germes sont très souvent groupés en microcolonies difficilement dissociables [2].

II. AVANTAGES DU MILIEU LIQUIDE. — L'analyse des terres pratiquée dans le laboratoire [3] (suivant la technique du manuel d'analyses de J. Pochon) utilise les milieux liquides pour la mesure de l'activité des fonctions physiologiques. Il y a donc intérêt, pour que les résultats soient comparables entre eux, à opérer toutes les mesures en milieu liquide. Les exemples suivants suffisent à démontrer la forme invraisemblable de certains résultats comparés en milieu liquide et en milieu solide :

	FLORE TOTALE (germes par gramme de terre)		FLORE PROTÉOLYTIQUE
	milieu liquide	milieu solide	
T. GIII	240 000 000	15 000 000	26 000 000
T. GrIII	260 000 000	13 000 000	30 000 000
T. II.	50 000 000	7 000 000	9 000 000
T. TI.	7 000 000	680 000	900 000

ce qui revient à trouver plus de germes doués de la fonction protéolytique (en milieu liquide), que de germes totaux (en milieu solide). Au contraire, si les deux mesures sont pratiquées en milieu liquide, la microflore protéolytique apparaît bien comme une fraction de la flore totale.

Nous pensons donc qu'il est de beaucoup préférable d'effectuer une numération en milieu liquide dont nous allons maintenant exposer la méthode.

III. TECHNIQUE EN MILIEU LIQUIDE. — Réaliser d'abord une série de dilutions décimales de 10^{-4} à 10^{-10} par la méthode habituelle. Dans ce cas, utiliser des tubes de 22 mm de diamètre contenant 5 ml de milieu extrait de terre. Répartir 0,5 ml de chacune des dilutions à raison de 5 tubes par dilution.

L'extrait est préparé ainsi : poids égal de terre et eau du robinet. Autoclavage, une heure à 130°. Filtration.

Il est important d'avoir un extrait de terre parfaitement clair. Pour ce faire, il faut laisser au repos trois jours le premier extrait, puis l'autoclaver une seconde fois à 115° pendant vingt minutes. Filtrer très soigneusement. Répartir en tubes de 22 mm, stériliser à 110° pendant vingt minutes.

On incube les tubes ensemencés à 33°. Après sept jours, la lecture se fait de la manière suivante : noter pour chaque dilution le nombre de tubes renfermant une culture appréciée par le trouble du milieu.

Supposons que les résultats soient les suivants :

5 tubes + pour les dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} compris ;

3 tubes + à 10^{-8} ;

2 tubes + à 10^{-9} ;

0 tube + à 10^{-10} .

On forme alors le « nombre caractéristique » qui est, dans ce cas, 532.

TABLE DE McCRADY

Nombre de tubes ensemencés pour chaque dilution : 5.

NOMBRE CARACTÉRISTIQUE	NOMBRE DE MICROBES						
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	23,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,0	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

En se reportant à la table de Mac Crady [3, 4] (voir tableau), on trouve 14 germes dans le volume ensemencé à la dernière dilution qui a donné 5 tubes + ; cette dilution étant 10^{-7} dans l'exemple cité, le nombre de germes contenus dans le volume d'ensemencement à la dilution 0 est

14×10^7 germes. Comme nous avons ensemencé 0,5 g de terre, à la dilution 0 on a :

$$2 \times 14 \times 10^7 = 28 \times 10^7 \text{ germes par gramme de terre.}$$

O. Martre [5] a déjà proposé une méthode voisine, certes plus précise mais infiniment plus longue : la numération se pratiquant en deux temps.

CONCLUSION. — Nous pensons que cette méthode, plus simple et plus rapide que celles déjà proposées, offre également l'avantage de donner des résultats homogènes et comparables à ceux obtenus dans le reste de l'analyse, elle-même effectuée en milieu liquide.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAVERGNE (D.) et AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 447.
 - [2] AUGIER (J.) et LAVERGNE (D.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
 - [3] In CALMETTE, BOQUET, NÈGRE et BRETEY. *Techniques de Microbiologie et de Sérologie*, Masson, édit.
 - [4] In POCHON (J.). *Techniques d'analyse microbiologique du sol*, Masson, édit.
 - [5] MARTRE (O.). *VIII^e Congr. intern. de Bact.*, 1954, **521**, 22. (*Suite et fin de la séance en novembre.*)
-

AVIS

L'Académie de la République Populaire Roumaine, le Ministère de la Santé et la Société des Sciences médicales organisent le « Congrès National des Sciences Médicales » qui aura lieu à Bucarest, du 25 au 30 novembre 1956, avec la participation d'invités de tous les pays.

Pour tous renseignements s'adresser aux représentants de l'Office National de Tourisme « Carpati » ou directement au Comité d'Organisation du Congrès, Bucarest, 125, Calea Victoriei.

LIVRES REÇUS

Bacterial anatomy. The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology. 1 vol., 360 p., Cambridge University Press, édit., Cambridge, Angleterre, 1956. Prix : 30 shillings.

Communications présentées au VI^e Symposium de la Society for General Microbiology, qui s'est tenu à Londres en avril 1956. L'ouvrage comprend 15 articles, qui passent en revue les différents aspects morphologiques des bactéries, étudiés tant au microscope ordinaire qu'au microscope électronique dont la méthode des coupes fines a permis de

grands progrès. Une importante partie du volume est consacrée à la question de la génétique des bactéries, que l'on sait maintenant se rapprocher beaucoup de celle des plantes et des animaux, et aux nouvelles méthodes qui ont permis l'étude du matériel nucléaire bactérien ; plusieurs communications traitent des corps chromatiniens, des chromosomes et de leur mécanisme de division, de l'organisation du matériel nucléaire chez les bactéries, etc. De nombreuses figures et planches hors texte illustrent l'ouvrage.

H. T.

E. Calvet et H. Prat. — *Microcalorimétrie. Applications physico-chimiques et biologiques.* 1 vol., 396 p., 168 fig., 11 tableaux. Masson, édit., Paris, 1956. Prix : Broché : 4 500 fr. Cartonné toile : 5 200 fr.

Les importants perfectionnements que l'un des auteurs a apportés au microcalorimètre de Tian ont permis des progrès considérables dans l'étude par voie thermo-électrique des phénomènes lents et de faible débit calorifique. Grâce aux appareils actuellement utilisés, on peut enregistrer, en fonction du temps, des puissances calorifiques avec une erreur absolue inférieure à 1/1 000 de petite calorie par heure pendant des durées quasi illimitées.

Les deux premiers chapitres de cet ouvrage, rédigés par E. Calvet, sont consacrés à un rappel des principes sur lesquels repose la technique, à la discussion et au mode d'emploi des appareils et à l'exposé d'un certain nombre d'applications physico-chimiques.

La troisième partie, due au professeur Prat, traite des questions biologiques. Elle étudie le thermogramme des graines en germination, des microorganismes et cultures de tissus, des invertébrés et des vertébrés dans différentes conditions, mettant ainsi en évidence, d'une part les différences spécifiques des thermogrammes, d'autre part la modification de ceux-ci sous l'influence de divers facteurs physiques et chimiques. C'est ainsi, pour ne citer qu'un exemple, que l'on pourra constater les modifications de la thermogénèse des bactéries sous l'influence des antibiotiques.

Il semble, étant donné le nombre considérable d'applications de ces nouveaux appareils dans les domaines les plus variés des sciences expérimentales, qu'ils doivent devenir d'un emploi courant dans les laboratoires biologiques, physiques ou chimiques.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.